

# Xpert<sup>®</sup> NPM1 Mutation

**REF** GXNPM1-CE-10

Upute za upotrebu

**IVD** CE

## **Izjave o zaštitnom znaku, patentima i vlasničkim pravima**

### **Trademark, Patents, and Copyright Statements**

Cepheid<sup>®</sup>, the Cepheid logo, GeneXpert<sup>®</sup>, and Xpert<sup>®</sup> are trademarks of Cepheid, registered in the U.S. and other countries. All other trademarks are the property of their respective owners.

THE PURCHASE OF THIS PRODUCT CONVEYS TO THE BUYER THE NON-TRANSFERABLE RIGHT TO USE IT IN ACCORDANCE WITH THESE INSTRUCTIONS FOR USE. NO OTHER RIGHTS ARE CONVEYED EXPRESSLY, BY IMPLICATION OR BY ESTOPPEL. FURTHERMORE, NO RIGHTS FOR RESALE ARE CONFERRED WITH THE PURCHASE OF THIS PRODUCT.

© 2022–2023 Cepheid.

See Section 28, Revision History for a description of changes.

Cepheid<sup>®</sup>, logotip Cepheid, GeneXpert<sup>®</sup> i Xpert<sup>®</sup> zaštitni su znakovi društva Cepheid, registriranog u SAD-u i drugim državama.

Svi ostali zaštitni znakovi vlasništvo su svojih odnosnih vlasnika.

KUPNJOM OVOG PROIZVODA KUPCU SE DODJELJUJE NEPRENOSIVO PRAVO NA NJEGOVU UPOTREBU U SKLADU S OVIM UPUTAMA ZA UPOTREBU. NIKAKVA SE DRUGA PRAVA NE DODJELJUJU IZRIČITO, IMPLICITNO ILI PREKLIZIJOM. NADALJE, KUPNJOM OVOG PROIZVODA NE DODJELJUJU SE NIKAKVA PRAVA NA PREPRODAJU.

© 2022–2023 Cepheid.

Pogledajte Odjeljak 28, Povijest revizija za opis promjena.

# Xpert<sup>®</sup> NPM1 Mutation

---

Za *in vitro* dijagnostičku upotrebu.

## 1 Zaštićeni naziv

Xpert<sup>®</sup> NPM1 Mutation

## 2 Uobičajeni ili ustaljeni naziv

Xpert NPM1 Mutation

## 3 Predviđena svrha

### 3.1 Namjena

Test Xpert NPM1 Mutation, koji se provodi na instrumentu GeneXpert<sup>®</sup> Dx System tvrtke Cepheid je *in vitro* dijagnostički test za kvantifikaciju transkripata mRNK mutantnog gena NPM1 (tipova A, B i D u egzonu 12) u uzorcima periferne krvi bolesnika s akutnom mijeloičnom leukemijom (AML). Test upotrebljava automatiziranu lančanu reakciju polimerazom reverzne transkriptaze u stvarnom vremenu (RT-PCR) i prijavljuje postotni omjer transkripata mRNK endogene kontrole mutantnog gena NPM1 i ABL1. Test je namijenjen kao pomoć u nadzoru bolesnika s AML-om s mutiranim genom NPM1 za razinu transkripata mRNK mutantnog gena NPM1. Test treba upotrebljavati zajedno s ostalim kliničkopatološkim faktorima.

Test Xpert NPM1 Mutation ne razlikuje transkripte mutantnog gena NPM1 tipa A, B ili D i ne otkriva niti ne nadzire ostale rijetke vrste mutantnog gena NPM1. Ovaj test nije namijenjen za dijagnozu AML-a.

### 3.2 Predviđeni korisnik/okruženje

Test Xpert NPM1 Mutation trebaju upotrebljavati obučeni korisnici u laboratorijskom okruženju.

## 4 Sažetak i objašnjenje

Akutna mijeloična leukemija (AML) rak je mijeloičnih krvotvornih matičnih hematopoetskih stanica u koštanoj srži<sup>1,2</sup> i poznato je da ima razne mutacije egzona 12 nukleofosmina (NPM1)<sup>3</sup>. Umetanje nukleotida u egzon 12 dovodi do mutacija pomaka okvira čitanja i stvara nuklearni izlazni signal (NES). Mutacije u genu NPM1 dovode do aberantne citoplazmatske lokalizacije gena NPM1 i proteina koji djeluju u interakciji s genom NPM1. NPM1 je jedan od najčešće mutiranih gena u AML-u, a mutacije se događaju u 28 % do 35 % svih slučajeva AML-a. Iako se trenutačno istražuje nekoliko lijekova koji su usmjereni na mutirani NPM1, trenutačno nema dostupnih ciljnih terapija koje je odobrila američka Agencija za hranu i lijekove.<sup>4</sup>

Gen NPM1 kodira protein za nuklearnu transportaciju koji ima ulogu u biologiji centrosoma i ribosoma, kao i regulaciji ostalih staničnih sustava, uključujući putove za supresiju tumora. NPM1 je nukleolarni fosfoprotein koji služi za prelazak između jezgre i citoplazme. Regulira prijenos ribosomskih čestica kroz jezgenu membranu. Mutacije gena NPM1 prvi su put otkrivene u pojedinaca s AML-om nakon uočavanja neuobičajene citoplazmatske lokacije umjesto uobičajene jezgrene lokacije. Genetska procjena leukemijskih blasti u kombinaciji s lokacijom gena NPM1 u citoplazmi dovela je do saznanja o poznatim mutacijama pomaka okvira čitanja egzona 12.<sup>3</sup> Najčešće su mutacije gena NPM1 tip A (~ 75 – 80 %), tip B (~ 10 %) i tip D (~ 5 %), sve u egzonu 12, što dovodi do mutacije pomaka okvira čitanja umetanjem četiri nukleotida. Mutacija izaziva gubitak signala nukleolarne lokalizacije i aberantne citoplazmatske lokacije proteina u bolesnika s AML-om.<sup>5</sup>

## 5 Načelo postupka

Test Xpert NPM1 Mutation je automatizirani test za kvantifikaciju količine transkripata mutacije gena NPM1 kao omjera mutacije gena NPM1/ABL1. Test se provodi na sustavu Cepheid GeneXpert Dx System, koji automatizira i integrira pročišćavanje uzorka, amplifikaciju nukleinske kiseline i otkrivanje ciljne sekvence u jednostavnim ili složenim uzorcima pomoću testova RT-PCR u stvarnom vremenu i ugniježdenih testova PCR. Sustav se sastoji od instrumenta, računala i unaprijed instaliranog softvera za pokretanje testova i pregled rezultata. Sa sustavom je potrebno upotrebljavati jednokratne uloške GeneXpert koji primaju reagense za RT-PCR i ugniježdene reagense za PCR i provode postupke RT-PCR i ugniježdeni PCR. Za potpuni opis sustava proučite odgovarajući *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

Test Xpert NPM1 Mutation uključuje reagense za otkrivanje mutacije gena NPM1 i transkript za ABL1 kao endogenu kontrolu u uzorcima periferne krvi. Količina transkripta mutacije gena NPM1 kvantificira se kao postotni omjer mutacije gena NPM1/ABL1. Dvije kontrole uključene su u test Xpert NPM1 Mutation – endogena kontrola (ABL1) i kontrola provjere sonde (PCC). Endogena kontrola za ABL1 normalizira cilj mutacije gena NPM1 i osigurava da je u testu upotrijebljena dovoljna količina uzorka. PCC provjerava rehidraciju reagensa, napunjenost epruvete za PCR te da su sve sastavnice reakcije prisutne i funkcionalne u ulošku, uključujući sonde i boje.

## 6 Reagensi i instrumenti

### 6.1 Isporučeni materijali

Komplet Xpert NPM1 Mutation (GXNPM1-CE-10) sadrži dovoljno reagensa za obradu 10 uzoraka testa ili uzoraka kontrole kvalitete. Komplet sadrži sljedeće:

#### Xpert NPM1 Mutation Reagensi

10 od svakog po kompletu

<b>Proteinaza K (PK)</b>	<b>10 x 130 µl po bočici</b>
<b>Sastavnica</b>	<b>Sastojak reagensa</b>
Proteinaza K	< 5 %

<b>Reagens za lizu (LY) (gvanidin klorid)</b>	<b>10 x 5,3 ml po bočici</b>
<b>Sastavnica</b>	<b>Sastojak reagensa</b>
Gvanidin klorid	25 – 50 %
Ureja	25 – 50 %
Natrijev dodecil sulfat	< 2 %

<b>Reagens za pranje</b>	<b>10 x 2,9 ml po ampuli</b>
<b>Sastavnica</b>	<b>Sastojak reagensa</b>
Etanol	< 50 %
Gvanidin tiocijanat	< 50 %

Xpert NPM1 Mutation Uloške s ugrađenim reakcijskim epruvetama		10 po kompletu
Sastavnica	Sastojak reagensa	Količina
Kuglicu 1 (osušenu zamrzavanjem)	Enzim: Taq DNK polimeraza < 50 U/kuglica	1 po ulošku
	dNTP-ovi < 0,05 %	
Kuglicu 2 (osušenu zamrzavanjem)	Početnice i sonde < 0,005%	1 po ulošku
Kuglicu 3 (osušenu zamrzavanjem)	Početnice i sonde < 0,005%	1 po ulošku
Kuglicu 4 (osušenu zamrzavanjem)	Enzim: Taq DNK polimeraza < 50 U/kuglica	1 po ulošku
	dNTP-ovi < 0,05 %	
Reagens za ispiranje	Kalijev klorid < 4 %	2 ml po ulošku
	Natrijev azid < 0,1 %	
	Polietilen glikol < 40 %	
	Polisorbat 20 < 0,2 %	
Reagens za eluiranje	Trizma baza < 0,3 %	2,5 ml po ulošku
	Trizma hidroklorid < 0,1 %	
	Natrijev azid < 0,05 %	

**CD****1 po kompletu**

- Datoteku definicije analize (ADF)
- Uputu za uvoz ADF-a u softver GeneXpert
- Upute za upotrebu

**Bilješka**

Goveđi serumski albumin (BSA) u kuglicama u ovom proizvodu proizveden je isključivo od goveđe plazme koja potječe iz Sjedinjenih Država. Životinje nisu hranjene proteinima preživača ili nekih drugih životinja; životinje su podvrgnute testiranju prije i nakon smrti. Tijekom obrade nije bilo miješanja materijala s drugim životinjskim materijalima.

**Bilješka**

Potvrde o analizi i tehnički listovi sa specifikacijama serije dostupni su putem Tehničke podrške društva Cepheid.

## 7 Potrebni materijali koji nisu isporučeni

- Sustav GeneXpert Dx System (kataloški broj ovisi o konfiguraciji): instrument GeneXpert, računalo, čitač crtičnih kodova i korisnički priručnik.
- Za GeneXpert Dx System: GeneXpert Dx verzija softvera 6.2 ili novija.
- Pisač: Ako je potreban pisač, obratite se Tehničkoj podršci društva Cepheid da biste dogovorili kupnju preporučenog pisača.
- Vrtložna miješalica
- Mikrocentrifuga (najmanje 1000 x g)
- Pipete i vrhovi pipeta s aerosolnim filtrom
- Konusne epruvete od 50 ml
- Apsolutni etanol reagensijske čistoće
- 1X PBS, pH 7,4

## 8 Čuvanje i rukovanje

- Čuvajte sadržaj kompleta Xpert NPM1 Mutation na 2 do 8 °C do isteka roka valjanosti navedenog na etiketi.
- Ne otvarajte poklopac uloška dok niste spremni provesti test.

- Nemojte upotrebljavati uloške kojima je istekao rok valjanosti.
- Nemojte upotrebljavati uložak na kojemu je došlo do curenja.
- Reagens za pranje prozorna je, bezbojna tekućina. Nemojte upotrebljavati reagens za pranje ako se zamutio ili promijenio boju.
- Dvadeset (20) minuta prije početka postupka izvadite uzorak krvi, uložak i reagens za pripremu uzorka iz skladišta kako bi dosegli sobnu temperaturu (20 °C do 30 °C).

## 9 Upozorenja i mjere opreza

### 9.1 Općenito

- Za *in vitro* dijagnostičku upotrebu.
- Sa svim biološkim uzorcima, uključujući iskorištene uloške i reagens, postupajte kao da mogu prenijeti uzročnike zaraznih bolesti. Budući da često nije moguće znati koji bi biološki uzorci mogli biti zarazni, sa svim biološkim uzorcima treba postupati primjenjujući standardne mjere opreza.
- Smjernice za rukovanje uzorkom dostupne su u Centrima za kontrolu i prevenciju bolesti<sup>6</sup> i Institutu za kliničke i laboratorijske standarde u SAD-u.<sup>7</sup>
- Slijedite sigurnosne procedure svoje ustanove za rad s kemikalijama i rukovanje biološkim uzorcima.
- Karakteristike učinkovitost ovog testa utvrđene su samo pomoću krvi prikupljene u EDTA epruvete. Funkcija testa nije procijenjena s drugim vrstama uzoraka.
- Pouzdani rezultati ovise o odgovarajućem prikupljanju, prijevozu, čuvanju i obradi uzoraka. Pogrešni rezultati testa mogu se javiti zbog neodgovarajućeg prikupljanja, rukovanja ili skladištenja uzorka, tehničke pogreške, zamjene uzoraka ili zbog toga što je ciljni transkript u uzorku ispod granice otkrivanja testa. Da bi se izbjegli pogrešni rezultati, potrebno je pažljivo se pridržavati ovih uputa za upotrebu i *GeneXpert Dx System Operator Manual*.
- Provedba testa Xpert NPM1 Mutation izvan preporučenih raspona temperature i vremena čuvanja kompleta ili uzorka može dati pogrešne ili nevažne rezultate.
- Biološki uzorci, prijenosni pribor i iskorišteni ulošci trebaju se smatrati sposobnima za prijenos uzročnika zaraznih bolesti te su potrebne standardne mjere opreza. Za pravilno odlaganje iskorištenih uložaka i neiskorištenih reagensa slijedite postupke za upravljanje otpadom svoje ustanove. Ti materijali mogu pokazivati značajke opasnog kemijskog otpada, za što su potrebni posebni nacionalni ili regionalni postupci za odlaganje. Ako nacionalni ili regionalni propisi ne pružaju jasne upute o pravilnom odlaganju, biološki uzorci i iskorišteni ulošci trebaju se odložiti prema smjernicama za rukovanje i odlaganje medicinskog otpada SZO-a [Svjetske zdravstvene organizacije].<sup>8</sup>

### 9.2 Uzorak

- Održavajte ispravne uvjete skladištenja radi osiguranja cjelovitosti uzorka (pogledajte Odjeljak 11, Prikupljanje i čuvanje uzoraka). Nije procijenjena stabilnost uzorka u nekim drugim uvjetima transporta osim onih preporučenih.
- Nemojte zamrzavati uzorak periferne krvi obrađen EDTA-om.
- Ispravno prikupljanje uzorka, skladištenje i transport od ključne su važnosti za ispravne rezultate.


### 9.3 Test/reagens

- Nemojte zamjenjivati reagens Xpert NPM1 Mutation drugim reagensima.
- Nemojte otvarati poklopac uloška Xpert NPM1 Mutation osim radi dodavanja uzorka i reagensa za pranje.
- Nemojte upotrebljavati uložak koji vam je ispao nakon što ste ga izvadili iz pakiranja.
- Nemojte tresti uložak. Ako protresete uložak nakon otvaranja poklopca uloška ili vam ispadne, možete dobiti nevažne rezultate.
- Nemojte stavljati ID naljepnicu uzorka na poklopac uloška ili na naljepnicu s crtičnim kodom na ulošku.
- Nemojte upotrebljavati uložak s oštećenom naljepnicom s crtičnim kodom.
- Nemojte upotrebljavati uložak s oštećenom reakcijskom epruvetom.
- Preporučuje se da ulošci Xpert NPM1 Mutation budu na sobnoj temperaturi (20 °C do 30 °C) prilikom korištenja za testiranje.
- Svaki uložak za jednokratnu upotrebu Xpert NPM1 Mutation koristi se za obradu jednog testa. Nemojte ponovno upotrebljavati obrađene uloške.

- Prenesite cjelokupan sadržaj jedne (1) ampule s reagensom za pranje u komoru s reagensom za pranje. Ako propustite dodati reagens za pranje, može doći do lažnog rezultata **NIJE OTKRIVEN (NOT DETECTED)**.
- Nemojte višekratno upotrebljavati vrhove pipeta.
- Nemojte upotrebljavati uložak ako djeluje mokro ili ako vam se čini da je brtva na poklopcu potrgana.
- Nemojte upotrebljavati uložak Xpert NPM1 Mutation ako je reagens dodan u neispravan otvor.
- Nemojte otvarati uloške Xpert NPM1 Mutation nakon završetka testa.
- Odredite skup pipeta i reagensa isključivo za pripremu uzorka.
- Nosite čiste laboratorijske kute i rukavice. Promijenite rukavice između obrade svakog uzorka.
- U slučaju prolijevanja uzoraka ili kontrola nosite rukavice i počistite prolivenu tekućinu upijajućim papirnatim ručnicima. Zatim dobro očistite kontaminirano područje svježe pripremljenom otopinom kućnog izbjeljivača s klorom u omjeru 1:10. Konačna koncentracija aktivnog klora treba biti 0,5 %, bez obzira na koncentraciju kućnog izbjeljivača s klorom u vašoj zemlji. Vrijeme kontakta treba iznositi najmanje dvije minute.
- Provjerite da je radna površina suha prije upotrebe 70 %-tnog denaturiranog etanola za uklanjanje ostataka izbjeljivača. Pustite da se radne površine potpuno osuše prije nastavka rada. Možete slijediti i standardne postupke svoje ustanove za slučajeve kontaminacije ili prolijevanja. Slijedite preporuke proizvođača za dekontaminaciju opreme.

## 10 Kemijske opasnosti

**Bilješka** Informacije u nastavku odnose se cijeli proizvod koji sadržava proteinazu K, reagens za lizu, pranje i ispiranje.

- Piktogram opasnosti prema Uredbi o razvrstavanju, označavanju i pakiranju tvari i smjesa (CLP)/ Globalno usklađenom sustavu razvrstavanja i označavanja kemikalija (GHS): 
- Oznaka opasnosti: OPASNOST
- **Oznake upozorenja prema Globalno usklađenom sustavu razvrstavanja i označavanja kemikalija Ujedinjenih naroda (UN GHS)**
  - Lako zapaljiva tekućina i para H225.
  - Uzrokuje nadraživanje kože H315.
  - Uzrokuje ozbiljno nadraživanje očiju H319.
  - Može izazvati pospanost ili vrtoglavicu H336.
  - Sumnja se da uzrokuje genetska oštećenja H341.
- **Oznake obavijesti prema Globalno usklađenom sustavu razvrstavanja i označavanja kemikalija Ujedinjenih naroda (UN GHS)**
  - **Prevenција**
    - Prije upotrebe proučite sigurnosno-tehnički list za posebne upute.
    - Nabavite posebne upute prije upotrebe.
    - Nemojte upotrebljavati dok ne pročitate i shvatite sve sigurnosne mjere opreza.
    - Držati podalje od topline, iskrenja, otvorenog plamena i/ili vrućih površina. Zabranjeno pušenje.
    - Držite spremnik čvrsto zatvorenim.
    - Izbjegavajte udisanje maglice/para/raspršivača.
    - Nakon rukovanja proizvodom temeljito oprati ruke.
    - Upotrebljavati samo na otvorenome ili na prozračnom mjestu.
    - Nosite zaštitne rukavice/zaštitnu odjeću/zaštitu za oči/zaštitu za lice.
    - Ako je potrebno, koristite se osobnom zaštitnom opremom.
  - **Reakcija**
    - U slučaju POŽARA: Upotrijebite odgovarajuće sredstvo za gašenje.
    - U SLUČAJU UDISANJA: premjestiti osobu na svjež zrak i postaviti ju u položaj koji olakšava disanje.
    - Ako se ne osjećate dobro, nazovite CENTAR ZA TROVANJA ili liječnika.
    - U SLUČAJU DODIRA S KOŽOM (ili kosom): odmah skinite svu kontaminiranu odjeću. Isperite kožu vodom/ tuširanjem.
    - Specifično liječenje potražite u dodatnim informacijama o prvoj pomoći.
    - Prije ponovne upotrebe skinite kontaminiranu odjeću i operite je.
    - Ako dođe do nadraživanja kože: potražite savjet/liječničku pomoć.

- U SLUČAJU DODIRA S OČIMA: pažljivo ispirite vodom nekoliko minuta. Skinite kontaktne leće, ako ih nosite i ako se lako skidaju. Nastaviti ispiranje.
- Ako nadraživanje oka ne prestaje: potražite savjet/liječničku pomoć.
- U slučaju izloženosti ili razloga za zabrinutost: potražite savjet/liječničku pomoć.
- **Skladištenje/odlaganje**
  - Držati na hladnome.
  - Čuvati na prozračnome mjestu.
  - Držite spremnik čvrsto zatvorenim.
  - Čuvajte zaključanim.
  - Odložite sadržaj i/ili spremnik u otpad u skladu s lokalnim, regionalnim, nacionalnim i/ili međunarodnim propisima.

## 11 Prikupljanje i čuvanje uzoraka

- Uzorke periferne krvi treba prikupiti u EDTA epruvete pridržavajući se smjernica svoje ustanove. Plazma se ne smije razdvajati od stanica.
- Uzorke treba čuvati na 2 °C do 8 °C najviše 3 dana (72 sata) prije testiranja.
- Ispravno prikupljanje i čuvanje uzoraka od ključne su važnosti za funkciju testa. Stabilnost uzorka u nekim drugim uvjetima čuvanja osim onih navedenih u Odjeljak 12, Postupak u nastavku nije procijenjena testom Xpert NPM1 Mutation.

## 12 Postupak

### 12.1 Prije početka

Dvadeset (20) minuta prije početka postupka izvadite uzorak krvi, reagens za pripremu uzorka i uloške iz hladnog spremišta kako bi dostigli sobnu temperaturu. Kratko izdvojite proteinazu K (PK) centrifugiranjem u mikrocentrifugi.

---

**Važno** Pokrenite test u roku od sat vremena nakon dodavanja uzorka obrađenog reagensom za uzorak u uložak.

---

**Važno** Prije pripreme uzorka izvadite uložak iz kartonskog pakiranja. (Proučite Odjeljak 12.3, Priprema uloška).

---

### 12.2 Priprema uzorka

#### 12.2.1 Priprema uzorka s nepoznatim brojem leukocita ili uzorka s manje od 30 milijuna leukocita/ml

1. Na dno nove označene konusne epruvete od 50 ml dodajte 100 µl proteinaze K (PK).
2. Pobrinite se da se uzorak krvi dobro promiješa preokretanjem epruvete za prikupljanje krvi 8 puta neposredno prije pipetiranja. Pogledajte upute proizvođača za epruvetu za prikupljanje EDTA krvi.
3. U epruvetu koja već sadržava PK dodajte 4 ml uzorka krvi.
4. Kontinuirano miješajte uzorak u vrtložnoj miješalici 3 sekunde na najvećoj postavci.
5. Inkubirajte 1 minutu na sobnoj temperaturi.
6. U istu epruvetu dodajte 2,5 ml reagensa za lizu (LY).

---

**Bilješka** Sačuvajte preostali reagens za lizu za ponovnu upotrebu u koraku 13.

---

7. Kontinuirano miješajte uzorak u vrtložnoj miješalici 10 sekundi na najvećoj postavci.
8. Inkubirajte 5 minuta na sobnoj temperaturi.
9. Kontinuirano miješajte uzorak u vrtložnoj miješalici 10 sekundi na najvećoj postavci.
10. Inkubirajte 5 minuta na sobnoj temperaturi.
11. Promiješajte uzorak tako da deset puta lupnete dnom epruvete.
12. Prenesite 1 ml pripremljenog lizata u novu označenu konusnu epruvetu od 50 ml.



**Bilješka** Preostali lizat može se čuvati na 2 – 8 °C do 48 sati ili se može čuvati na temperaturi od – 20 °C ili nižoj do mjesec dana.

13. U novu konusnu epruvetu koja sadržava lizat dodajte 1,5 ml sačuvanog reagensa za lizu (LY) iz 6. koraka.
14. Kontinuirano miješajte uzorak u vrtložnoj miješalici 10 sekundi na najvećoj postavci.
15. Inkubirajte 10 minuta na sobnoj temperaturi.
16. U istu konusnu epruvetu dodajte 2 ml apsolutnog etanola reagensijske čistoće (koji osigurava korisnik).
17. Kontinuirano miješajte uzorak u vrtložnoj miješalici 10 sekundi na najvećoj postavci. Stavite sa strane.
18. Odložite u otpad preostale reagense za PK ili LY.

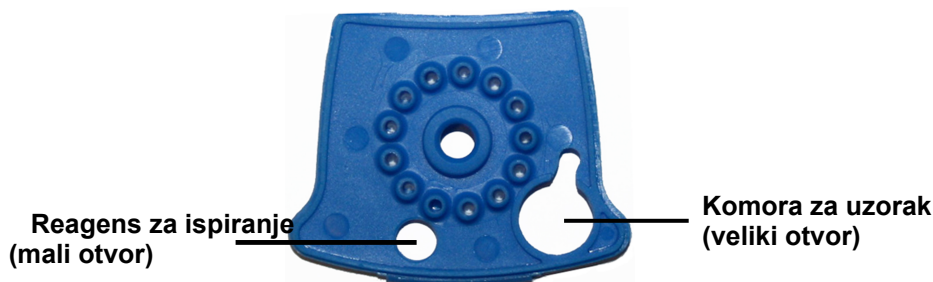
### 12.2.2 Priprema uzorka s brojem leukocita jednakim ili većim od 30 milijuna leukocita/ml

1. Na dno nove konusne epruvete od 50 ml dodajte 100 µl PK-a.
2. Pobrinite se da se uzorak krvi dobro promiješa preokretanjem epruvete za prikupljanje krvi 8 puta neposredno prije pipetiranja. Pogledajte upute proizvođača za epruvetu za prikupljanje EDTA krvi.
3. U epruvetu koja već sadrži PK dodajte 250 µl uzorka krvi i 3,75 ml 1xPBS (pH 7,4, koji osigurava korisnik).
4. Kontinuirano miješajte uzorak u vrtložnoj miješalici 3 sekunde na najvećoj postavci.
5. Inkubirajte 1 minutu na sobnoj temperaturi.
6. Slijedite korake 6 – 17 u Odjeljak 12.2.1 kako biste proizveli konačni lizat.
7. Odložite u otpad preostale reagense za PK ili LY.

## 12.3 Priprema uložka

Da biste dodali uzorak u uložak Xpert NPM1 Mutation:

1. Izvadite uložak iz kartonskog pakiranja.
2. Provjerite ima li na ulošku oštećenja. Ako je oštećen, nemojte ga koristiti.
3. Otvorite uložak podizanjem poklopca uloška i prenesite cjelokupan sadržaj jedne (1) ampule reagensa za pranje u komoru s reagensom za pranje (sa malim otvorom). Pogledajte Slika 1.
4. Pipetirajte cjelokupan sadržaj pripremljenog uzorka (4,5 ml) u komoru za uzorak (veliki otvor). Pogledajte Slika 1.



**Slika 1. Xpert NPM1 Mutation Uložak (pogled odozgo)**

5. Zatvorite poklopac uloška. Pobrinite se da poklopac dobro škljocne na svoje mjesto. Pokrenite test (pogledajte Odjeljak 12.4, Pokretanje testa).

## 12.4 Pokretanje testa

**Važno** Prije nego što pokrenete test, provjerite da sustav radi s verzijom softvera GeneXpert Dx 6.2 ili novijom te da je u softver uvezena ispravna datoteka definicije analize. Ovaj odjeljak navodi zadane korake za rad sa sustavom GeneXpert Dx System.

**Bilješka** Koraci koje je potrebno slijediti mogu se razlikovati ako je administrator sustava promijenio zadani tijekom rada sustava.

1. Uključite sustav GeneXpert tako što ćete prvo uključiti instrument GeneXpert Dx, a zatim računalo. Softver GeneXpert Dx pokrenut će se automatski ili će možda biti potrebno dvaput kliknuti na ikonu prečaca za softver GeneXpert Dx na radnoj površini sustava Windows®.
2. Prijavite se u softver GeneXpert svojim korisničkim imenom i lozinkom.

3. U prozoru **sustava GeneXpert** kliknite na **Izradi test (Create Test)** (GeneXpert Dx). Otvorit će se prozor **Izradi test (Create Test)**.
4. Očitajte ili upišite ID bolesnika (Patient ID). Ako upisujete ID bolesnika (Patient ID), pripazite da ga točno upišete. ID bolesnika povezan je s rezultatima testa i prikazuje se u prozoru **Prikaz rezultata (View Results)** i svim izvješćima. Pojavljuje se dijaloški okvir **Očitajte crtični kod s ID oznakom uzorka (Scan Sample ID barcode)**.
5. Očitajte ili upišite ID uzorka. Ako upisujete ID uzorka (Sample ID), pripazite da ga točno upišete. ID uzorka (Sample ID) prikazuje se na lijevoj strani prozora **Prikaz rezultata (View Results)** i svih izvješća. Pojavljuje se dijaloški okvir **Očitajte crtični kod uloška (Scan Cartridge barcode)**.
6. Očitajte crtični kod na ulošku Xpert NPM1 Mutation. Pomoću informacija na crtičnom kodu softver će automatski ispuniti okvire za sljedeća polja: ID serije reagensa (Reagent Lot ID), Serijski broj uloška (Cartridge SN) i Rok valjanosti (Expiration Date).

**Bilješka** Ako nije moguće skenirati crtični kod uloška Xpert NPM1 Mutation, ponovite test s novim uloškom. Ako ste očitali crtični kod uloška u softveru, a datoteka definicije analize nije dostupna, pojavit će se zaslon koji označava da datoteka definicije analize nije učitana u sustav. Ako se pojavi taj zaslon, obratite se Tehničkoj podršci društva Cepheid.

7. Kliknite na **Pokreni test (Start Test)**. U dijaloškom okviru koji se pojavi možda ćete trebati upisati svoju lozinku.
8. Otvorite vrata modula instrumenta dok trepti zeleno svjetlo i postavite uložak.
9. Zatvorite vrata. Test se pokreće, a zeleno svjetlo prestaje treperiti. Kad test završi, svjetlo se gasi.
10. Prije nego što otvorite vrata modula i izvadite uložak, pričekajte da sustav otključa vrata.
11. Odložite iskorištene uloške u odgovarajući spremnik za otpad od uzoraka u skladu sa standardnim praksama vaše ustanove.

**Bilješka** Vrijeme do rezultata iznosi manje od 3 sata (otprilike 30 minuta za pripremu uzorka izvan instrumenta i manje od 2,5 sata za pokretanje testa).

## 13 Prikaz i ispis rezultata

Ovaj odsječak navodi osnovne korake za prikaz i ispis rezultata. Detaljnije upute o prikazu i ispisu rezultata potražite u *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

- Za prikaz rezultata kliknite ikonu **Prikaz rezultata (View Results)**.
- Nakon završetka testa kliknite gumb **Izvješće (Report)** na zaslonu **Prikaz rezultata (View Results)** za prikaz i/ili izradu PDF datoteke s izvješćem.

## 14 Kontrola kvalitete

Svaki test uključuje endogenu kontrolu ABL1 i kontrolu provjere sonde (PCC).

**Endogena kontrola za ABL1** – endogena kontrola za ABL1 potvrđuje da je u testu upotrijebljena dovoljna količina uzorka. Uz to, ta kontrola otkriva inhibiciju testa PCR u stvarnom vremenu koja se povezuje s uzorkom. ABL1 zadovoljava ako ispunjava dodijeljene kriterije za prihvatanje.

**Kontrola provjere sonde (PCC)** – prije početka reakcije PCR sustav GeneXpert mjeri fluorescentni signal iz sonde s ciljem praćenja rehidracije kuglica, punjenja reakcijske epruvete te provjere jesu li sve komponente reakcije funkcionalne u ulošku. PCC zadovoljava ako ispunjava dodijeljene kriterije za prihvaćanje.

## 15 Tumačenje rezultata

Sustav GeneXpert automatski tumači rezultate na temelju izmjerenih fluorescentnih signala i ugrađenih algoritama za izračun te se ti rezultati prikazuju u prozoru Prikaz rezultata (View Results). Mogući rezultati i tumačenja prikazani su u Tablica 1.

Tablica 1. Xpert NPM1 Mutation Rezultati i tumačenje testa

Rezultat	Tumačenje
<p><b>Mutacija gena NPM1 OTKRIVENA (NPM1 Mutation DETECTED)</b></p> <p>Pogledajte Slika 2, Slika 3, Slika 4</p>	<p>Otkriven je transkript mutacije gena NPM1.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Mutacija gena NPM1 OTKRIVENA – transkript mutacije gena NPM1 otkriven je i ima prag ciklusa (Ct) unutar valjanog raspona te krajnju točku iznad postavke praga.</li> <li>Mogući otkriveni rezultati: <ul style="list-style-type: none"> <li>MUTACIJA GENA NPM1 OTKRIVENA [#,#%] (NPM1 MUTATION DETECTED [#,#%]); Slika 2.</li> <li>MUTACIJA GENA NPM1 OTKRIVENA [iznad gornjeg LoQ-a] (NPM1 MUTATION DETECTED [Above upper LoQ]); Slika 3.</li> <li>MUTACIJA GENA NPM1 OTKRIVENA [ispod LoD-a; &lt;#,#%] (NPM1 MUTATION DETECTED [Below LoD; #,#%]); Slika 4.</li> </ul> </li> <li>ABL ZADOVOLJAVA (PASS) – transkript ABL-a otkriven je i ima prag ciklusa (Ct) unutar valjanog raspona te krajnju točku iznad postavke praga.</li> <li>Provjera sonde ZADOVOLJAVA (PASS) – svi su rezultati provjere sonde zadovoljili.</li> </ul>
<p><b>Mutacija gena NPM1 NIJE OTKRIVENA (NPM1 Mutation NOT DETECTED)</b></p> <p>Pogledajte Slika 5</p>	<p>Transkript mutacije gena NPM1 nije otkriven.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Mutacija gena NPM1 NIJE OTKRIVENA [dovoljno transkripta ABL] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript]) – transkript mutacije gena NPM1 nije otkriven i ima prag ciklusa (Ct) nula ili iznad gornje granice valjanog raspona i/ili krajnju točku ispod postavke praga.</li> <li>ABL ZADOVOLJAVA (PASS) – transkript ABL-a otkriven je i ima prag ciklusa (Ct) unutar valjanog raspona te krajnju točku iznad postavke praga.</li> <li>Provjera sonde ZADOVOLJAVA (PASS) – svi su rezultati provjere sonde zadovoljili.</li> </ul>
<p><b>NEVAŽEĆI (INVALID)</b></p> <p>Pogledajte Slika 6, Slika 7, Slika 8, Slika 9, Slika 10</p>	<p>Razina transkripta mutacije gena NPM1 ne može se odrediti jer uzorak sadržava previše transkripta mutacije gena NPM1 i/ili previše ili nedovoljno transkripta ABL-a. Pogledajte Odjeljak 18, Vodič za otklanjanje poteškoća, za dodatne upute o ponovnom testiranju uzorka.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Mutacija gena NPM1 NEVAŽEĆA – prag ciklusa (Ct) gena NPM1 bio je iznad nule i ispod donje granice valjanog raspona (Slika 8, Slika 9)</li> <li>ABL NEUSPJEŠAN – prag ciklusa (Ct) za ABL nije bio unutar valjanog raspona ili je krajnja točka bila ispod postavke praga (Slika 6, Slika 7, Slika 8, Slika 10)</li> <li>Provjera sonde — ZADOVOLJAVA (PASS); svi su rezultati provjere sonde zadovoljili.</li> </ul>
<p><b>POGREŠKA (ERROR)</b></p> <p>Pogledajte Slika 11</p>	<p>Razina transkripta mutacije gena NPM1 ne može se odrediti. Pogledajte Odjeljak 18, Vodič za otklanjanje poteškoća, za dodatne upute o ponovnom testiranju uzorka.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Mutacija gena NPM1 NEMA REZULTATA (NO RESULT)</li> <li>ABL NEMA REZULTATA (NO RESULT)</li> <li>Provjera sonde NEUSPJEŠNA (FAIL) – svi ili jedan od rezultata provjere sonde nije uspio.</li> <li>Provjera sonde ZADOVOLJAVA (PASS) ili NP (nije primjenjivo) (NA (not applicable)) i prekid tlaka (Pressure Abort)*.</li> </ul> <p>*Ako je provjera sonde zadovoljila, pogrešku je uzrokovalo ograničenje maksimalnog tlaka koje je premašilo prihvatljivi raspon ili kvar dijela sustava.</p>
<p><b>NEMA REZULTATA (NO RESULT)</b></p>	<p>Razina transkripta mutacije gena NPM1 ne može se odrediti. Nije prikupljeno dovoljno podataka za dobivanje rezultata testa. Do toga može doći, na primjer, ako je korisnik zaustavio test koji je bio u tijeku. Pogledajte Odjeljak 18, Vodič za otklanjanje poteškoća, za dodatne upute o ponovnom testiranju uzorka.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Mutacija gena NPM1 NEMA REZULTATA (NO RESULT)</li> <li>ABL NEMA REZULTATA (NO RESULT)</li> <li>Provjera sonde NP (nije primjenjivo) (NA (not applicable))</li> </ul>

## 16 Kvantitativni rezultati

Kvantitativni izlazni podaci testa Xpert NPM1 Mutation navedeni su kao postotni omjer mutacije gena NPM1/ABL1. Kompletima su dodijeljene vrijednosti učinkovitosti specifične za seriju ( $E_{\Delta Ct}$ ) i faktora razmjera (SF) koje povezuju kvantifikaciju transkripata mutacije gena NPM1 (A, B i D) i ABL1 s brojevima kopija primarnih standarda *in vitro* transkribiranog RNK (IVT-RNK) sintetske mutacije gena NPM1 i ABL1.

Tablica 2. Primjeri rezultata testa Xpert NPM1 Mutation

Test	Mutantni gen NPM1		ABL		Xpert NPM1 Mutation Rezultati testa	Bilješke
	Ct	Rezultat <sup>a</sup>	Ct	Rezultat <sup>a</sup>		
1	5,2	NEVAŽEĆI (INVALID)	5,8	NEUSPJEŠAN (FAIL)	NEVAŽEĆI [previsoki transkripti mutacije gena NPM1 i ABL-a] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcripts])	NP (NA)
2	9	NEVAŽEĆI (INVALID)	5,5	NEUSPJEŠAN (FAIL)	NEVAŽEĆI [previsoki transkripti za ABL] (INVALID [Too high ABL transcripts])	NP (NA)
3	5,5	NEVAŽEĆI (INVALID)	8,5	ZADOVOLJAVA (PASS)	NEVAŽEĆI [previsoki transkripti mutacije gena NPM1] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcripts])	NP (NA)
4	25,0	NEVAŽEĆI (INVALID)	21,8	NEUSPJEŠAN (FAIL)	NEVAŽEĆI [nedovoljno transkripta za ABL] (INVALID [Insufficient ABL transcript])	NP (NA)
5	0	NEVAŽEĆI (INVALID)	0	NEUSPJEŠAN (FAIL)	NEVAŽEĆI [nema transkripta za ABL] (INVALID [No ABL transcript])	NP (NA)
6	8,5	POZ	13,6	ZADOVOLJAVA (PASS)	Mutacija gena NPM1 OTKRIVENA [iznad gornjeg LoQ-a] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ])	NP (NA)
7	22,5	POZ	14,8	ZADOVOLJAVA (PASS)	Mutacija gena NPM1 OTKRIVENA (NPM1 Mutation DETECTED) [1,05 %]	Prijavljena vrijednost: 1,05 %
8	27,9	POZ	14,0	ZADOVOLJAVA (PASS)	Mutacija gena NPM1 OTKRIVENA [ispod LoD-a; < 0,030 %] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; 0.030%])	NP (NA)
9	0	NEG	14,6	ZADOVOLJAVA (PASS)	NEGATIVAN [dovoljno transkripta ABL] (NEGATIVE [Sufficient ABL transcript])	NP (NA)
10	0	NEMA REZULTATA (NO RESULT)	0	NEMA REZULTATA (NO RESULT)	POGREŠKA (ERROR)	Na primjer, Pogreška 5017 [ABL] provjera sonde nije uspjela ([ABL] probe check failed)

<sup>a</sup> Pogledajte karticu Rezultati analita u softveru sustava GeneXpert Dx za pojedinosti.

## 16.1 Mutacija gena NPM1 OTKRIVENA [#.,##] % (NPM1 Mutation DETECTED [#.,##]%)

Mutacija gena NPM1 otkrivena je na razini od #.,## %.

Za rezultat „**Mutacija gena NPM1 OTKRIVENA [#.,##] % (NPM1 Mutation DETECTED [#.,##]%)**” mutacija gena NPM1 uočljiva je ako je Ct mutacije gena NPM1 veći ili jednak „6” te manji ili jednak „32”, a Ct ABL-a veći je ili jednak „6” te manji ili jednak „20”. Softver GeneXpert izračunava % pomoću sljedeće jednačbe, pri čemu se vrijednost Delta Ct ( $\Delta Ct$ ) dobiva iz formule Ct ABL-a minus Ct mutacije gena NPM1:

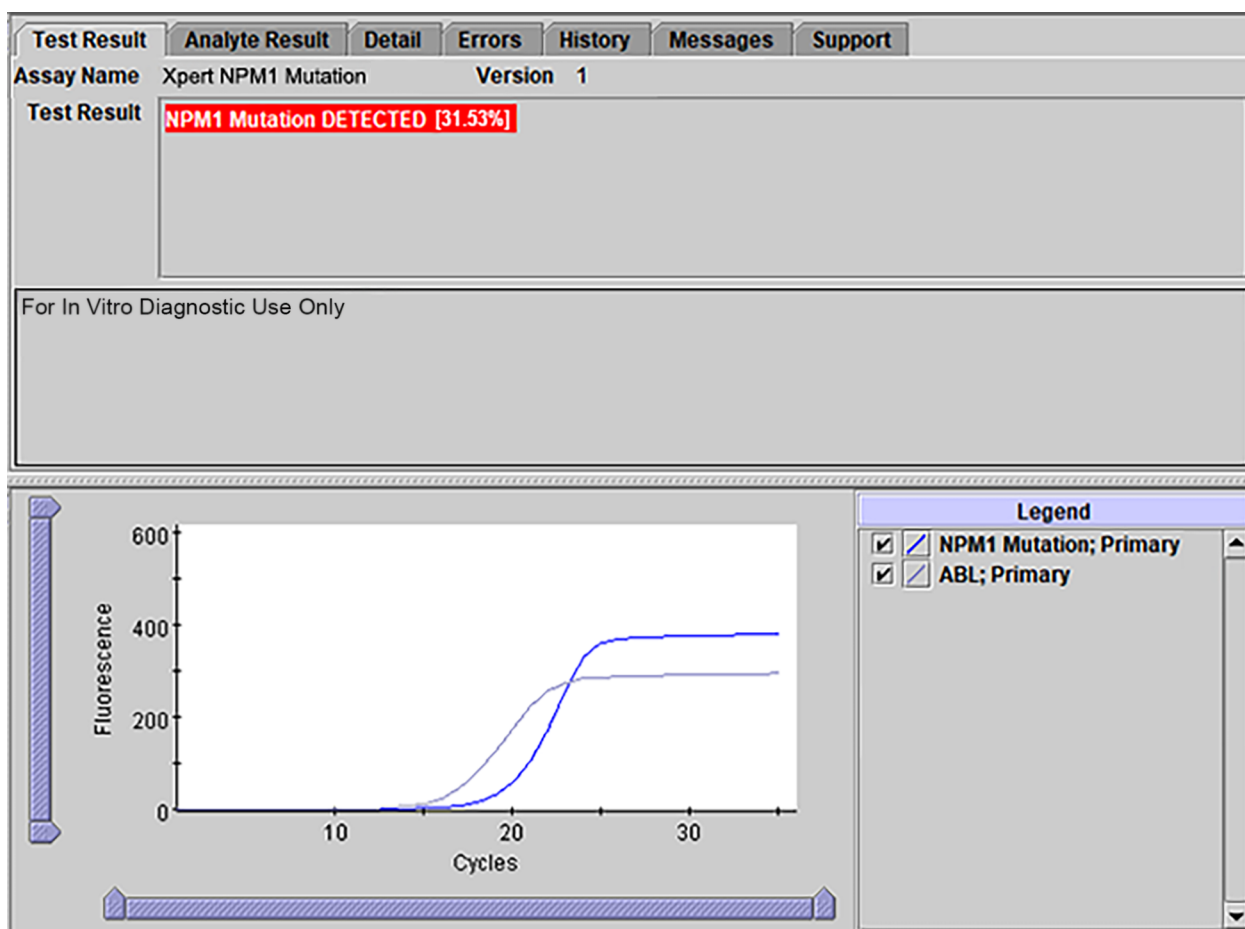
$$\% = E_{\Delta Ct}^{\Delta Ct} \times 100 \times \text{faktor razmjera}$$

### Bilješka

Faktor razmjera (*SF*) parametar je specifičan za seriju koji je ugrađen u crtični kod uložka testa. Vrijednost tog faktora i učinkovitost testa specifična za seriju ( $E_{\Delta Ct}$ ) određuju se testiranjem kontrole kvalitete svake serije testa upotrebom primarnih standarda kalibriranih prema brojevima kopija kalibratora *in vitro* transkribiranog RNK (IVT-RNK) sintetske mutacije gena NPM1 i ABL1 za kvantifikaciju transkripta mutacije gena NPM1.  $E_{\Delta Ct}$  postavljen je za 1,95; a vrijednost *SF* postavljena je za 1,79 za upotrebu u primjeru koji je ovdje prikazan.

**Primjer:**  $E_{\Delta Ct}$  specifičan za seriju = 1,95; *SF* = 1,79  
 Ct ABL-a testa = 14,5; Ct mutacije gena NPM1 = 17,1;  $\Delta Ct = - 2,6$   
 $\% = 1,95^{(-2,6)} \times 100 \times 1,79 = 31,53 \%$

**Rezultat:** **Mutacija gena NPM1 OTKRIVENA (NPM1 Mutation DETECTED) [31,53 %]**. Pogledajte Slika 2.



Slika 2. GeneXpert DxProzor Prikaz rezultata (View Results): Mutacija gena NPM1 OTKRIVENA (NPM1 Mutation DETECTED) [31,53 %]

## 16.2 Mutacija gena NPM1 OTKRIVENA [iznad gornjeg LoQ-a] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ])

Mutacija gena NPM1 otkrivena je na razini > 500 %.

Za rezultat „**Mutacija gena NPM1 OTKRIVENA [iznad gornjeg LoQ-a] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ])**” mutacija gena NPM1 uočljiva je ako je Ct mutacije gena NPM1 veći ili jednak „6” te manji ili jednak „32”, a Ct ABL-a veći je ili jednak „6” te manji ili jednak „20”. Softver GeneXpert izračunava % pomoću sljedeće jednadžbe, pri čemu se vrijednost Delta Ct ( $\Delta Ct$ ) dobiva iz formule Ct ABL-a minus Ct mutacije gena NPM1:

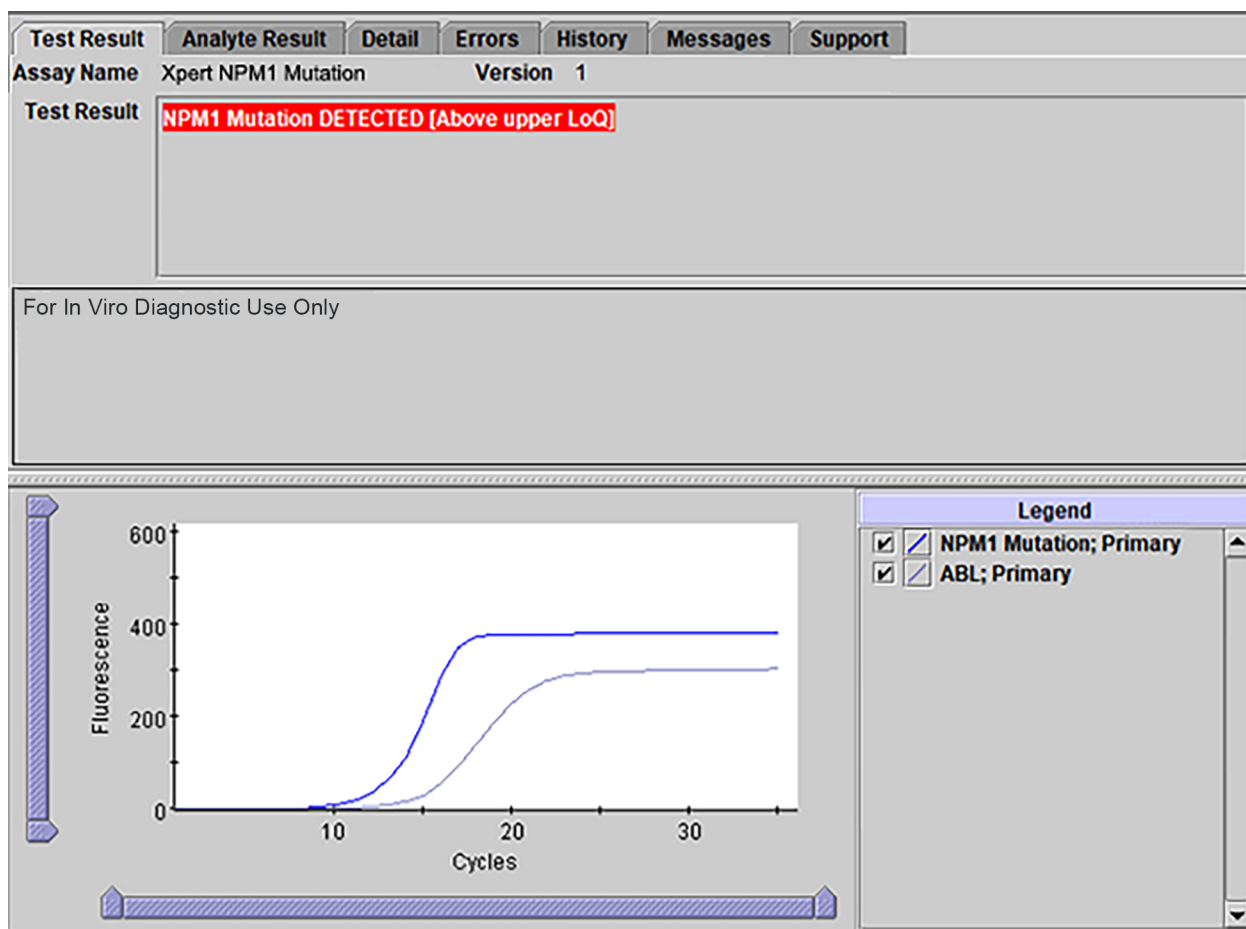
$$\% = E_{\Delta Ct}^{(\Delta Ct)} \times 100 \times \text{faktor razmjera (SF)}$$

### Bilješka

Faktor razmjera (SF) parametar je specifičan za seriju koji je ugrađen u crtični kod uložka testa. Vrijednost tog faktora i učinkovitost testa specifična za seriju ( $E_{\Delta Ct}$ ) određuju se testiranjem kontrole kvalitete svake serije testa upotrebom primarnih standarda kalibriranih prema brojevima kopija kalibratora *in vitro* transkribiranog RNK (IVT-RNK) sintetske mutacije gena NPM1 i ABL1 za kvantifikaciju transkripta mutacije gena NPM1.  $E_{\Delta Ct}$  postavljen je za 1,95; a vrijednost SF postavljena je za 1,79 za upotrebu u primjeru koji je ovdje prikazan.

**Primjer:**  $E_{\Delta Ct}$  specifičan za seriju = 1,95; SF = 1,79  
 Ct ABL-a testa = 13,4; Ct mutacije gena NPM1 = 10,2;  $\Delta Ct$  = 3,2  
 $\% = 1,95^{(3,2)} \times 100 \times 1,79 = 1516,92 \%$  je veći od definiranog gornjeg LoQ-a testa pri 500 %

**Rezultat:** **Mutacija gena NPM1 OTKRIVENA [iznad gornjeg LoQ-a] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ]).** Pogledajte Slika 3.



Slika 3. GeneXpert DxProzor Prikaz rezultata (View Results): Mutacija gena NPM1 OTKRIVENA [iznad gornjeg LoQ-a] (NPM1 Mutation DETECTED [Above upper LoQ])

### 16.3 Mutacija gena NPM1 OTKRIVENA [ispod LoD-a; < 0,030 %] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; 0.030%])

Mutacija gena NPM1 otkrivena je na razini < 0,030 %.

Za rezultat „**Mutacija gena NPM1 OTKRIVENA [ispod LoD-a; <0,030 %] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; 0.030%])**” mutacija gena NPM1 uočljiva je ako je Ct mutacije gena NPM1 veći ili jednak „6” te manji ili jednak „32”, a Ct ABL-a veći je ili jednak „6” te manji ili jednak „20”. Softver GeneXpert izračunava % pomoću sljedeće jednačbe, pri čemu se vrijednost Delta Ct ( $\Delta Ct$ ) dobiva iz formule Ct ABL-a minus Ct mutacije gena NPM1:

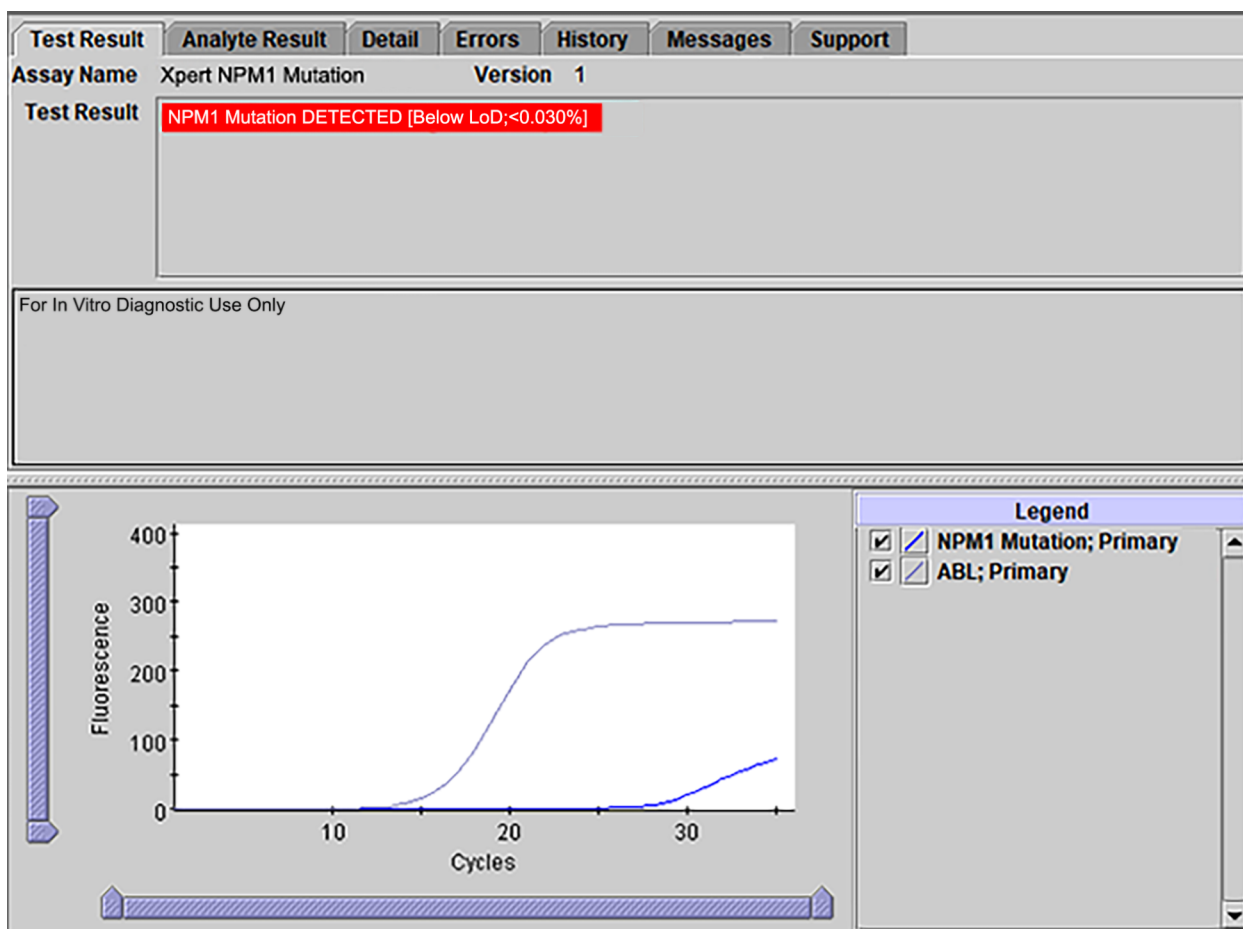
$$\% = E_{\Delta Ct}^{(\Delta Ct)} \times 100 \times \text{faktor razmjera (SF)}$$

#### Bilješka

Faktor razmjera (SF) parametar je specifičan za seriju koji je ugrađen u crtični kod uložka testa. Vrijednost tog faktora i učinkovitost testa specifična za seriju ( $E_{\Delta Ct}$ ) određuju se testiranjem kontrole kvalitete svake serije testa upotrebom primarnih standarda kalibriranih prema brojevima kopija kalibratora *in vitro* transkribiranog RNK (IVT-RNK) sintetske mutacije gena NPM1 i ABL1 za kvantifikaciju transkripta mutacije gena NPM1.  $E_{\Delta Ct}$  postavljen je za 1,95; a vrijednost SF postavljena je za 1,79 za upotrebu u primjeru koji je ovdje prikazan.

**Primjer:**  $E_{\Delta Ct}$  specifičan za seriju = 1,95; SF = 1,79  
 Ct ABL-a testa = 14,3; Ct mutacije gena NPM1 = 28,8;  $\Delta Ct = -14,5$   
 $\% = 1,95^{(-14,5)} \times 100 \times 1,79 = 0,011 \%$  je manji od definiranog LoD-a testa pri 0,030 %

**Rezultat:** **Mutacija gena NPM1 OTKRIVENA [ispod LoD-a; < 0,030 %] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; 0.030%])**. Pogledajte Slika 4.



Slika 4. Prozor za prikaz rezultata (View Results) GeneXpert: Mutacija gena NPM1 OTKRIVENA [ispod LoD-a; < 0,030 %] (NPM1 Mutation DETECTED [Below LoD; 0.030%])

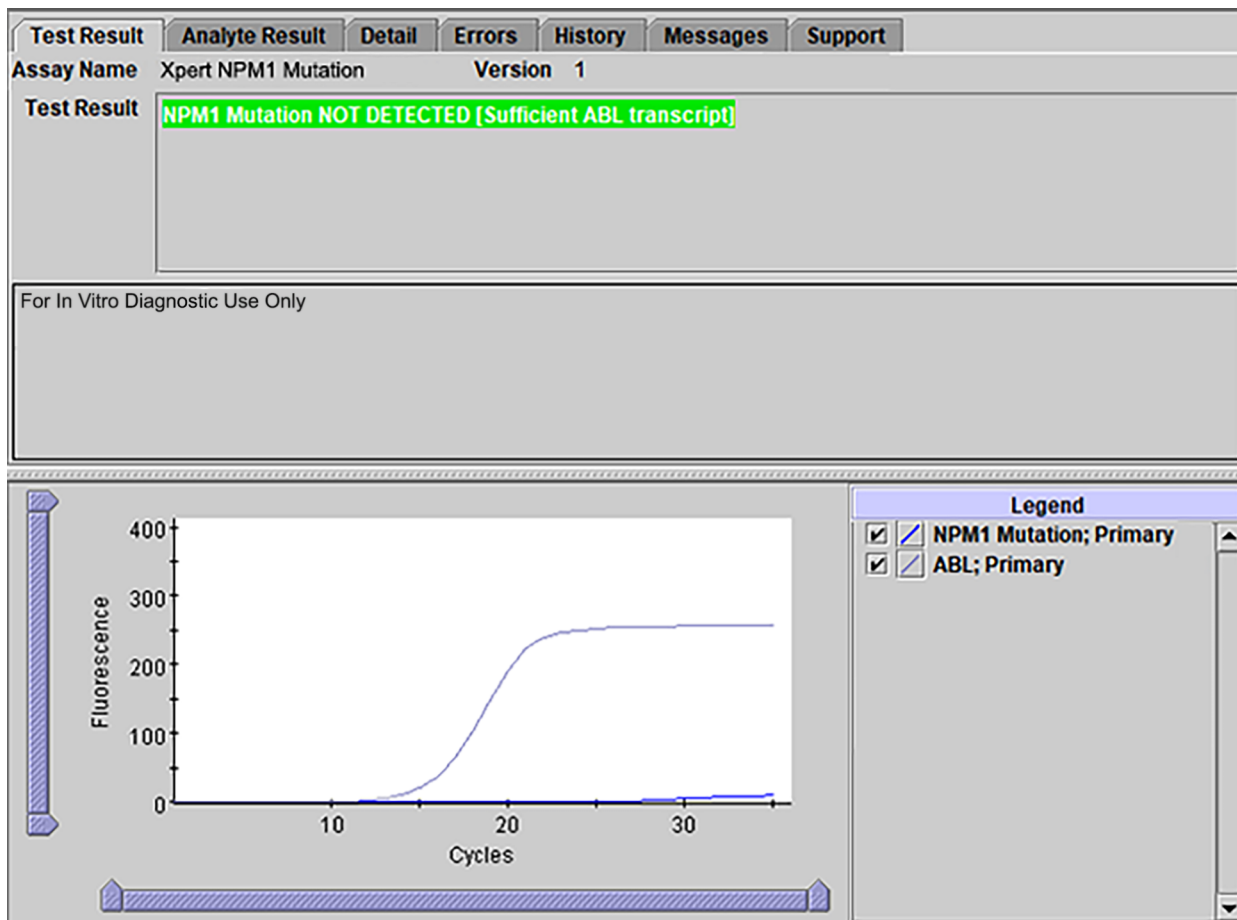
## 16.4 Mutacija gena NPM1 NIJE OTKRIVENA [dovoljno transkripta ABL-a] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript])

Mutacija gena NPM1 nije otkrivena uz Ct gena NPM1 jednak „0” ili veći od „32”, a Ct ABL-a veći od „6”, a manji ili jednak „20”.

Softver GeneXpert zahtijeva da Ct ABL-a bude veći ili jednak „6” te manji ili jednak „20” za test Xpert NPM1 Mutation kako bi se osiguralo „dovoljno transkripta ABL-a”. Pogledajte Odjeljak 15, Tumačenje rezultata, Tablica 1.

**Primjer:** Ct mutacije gena NPM1 na testu = 0; Ct ABL-a = 14,0 je između „6” i „20”.

**Rezultat:** **Mutacija gena NPM1 NIJE OTKRIVENA [dovoljno transkripta ABL-a] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript]).** Pogledajte Slika 5.



Slika 5. Prozor za prikaz rezultata (View Results) GeneXpert: Mutacija gena NPM1 NIJE OTKRIVENA [dovoljno transkripta ABL-a] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript])



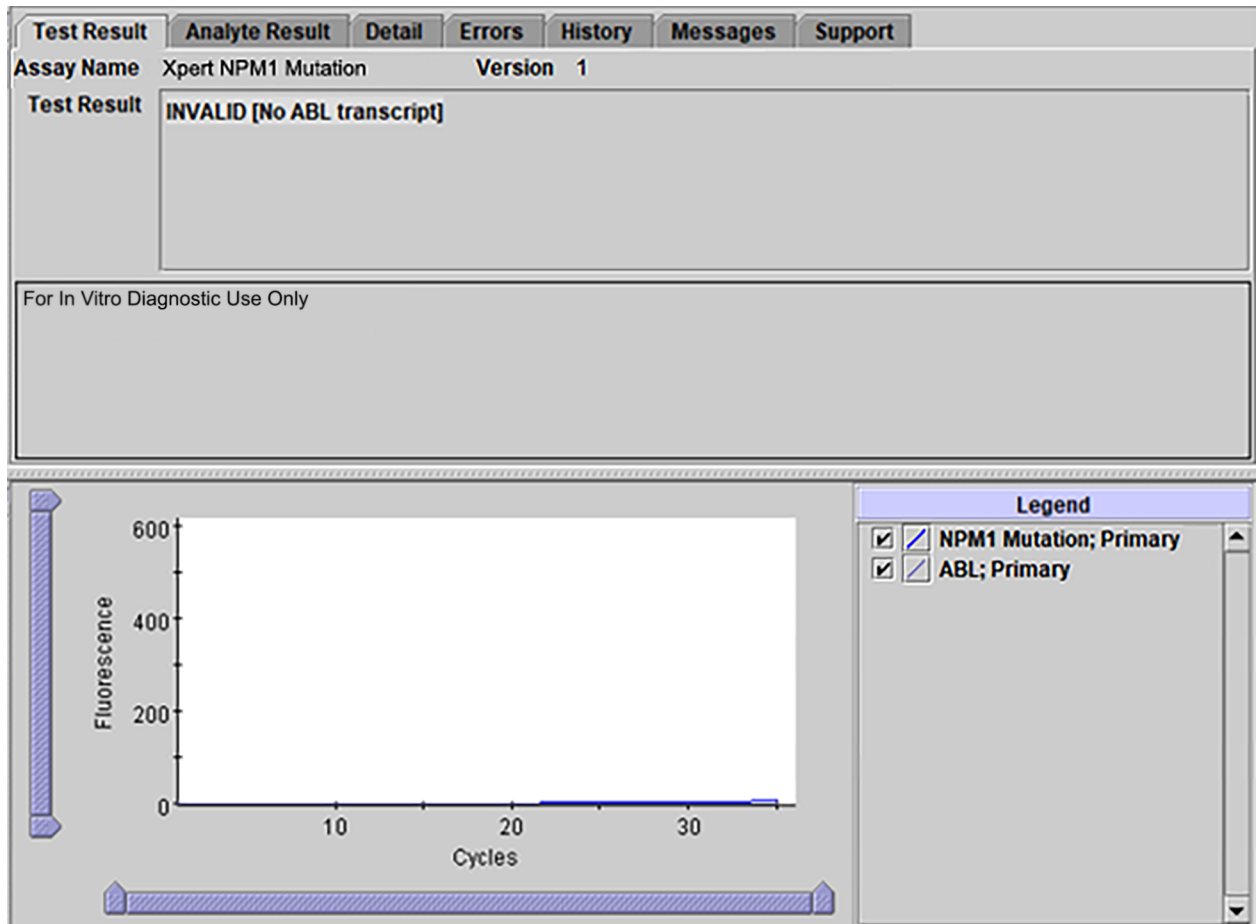
## 16.5 NEVAŽEĆI [nema transkripta za ABL] (INVALID [No ABL transcript])

Mutacija gena NPM1 otkrivena je ili nije otkrivena uz Ct ABL-a jednak „0”.

Softver GeneXpert zahtijeva da Ct ABL-a bude veći ili jednak „6” te manji ili jednak „20” za test Xpert NPM1 Mutation kako bi se osiguralo „dovoljno transkripta ABL-a”. Proučite Odjeljak 18, Vodič za otklanjanje poteškoća.

**Primjer:** Ct mutacije gena NPM1 na testu = 0; Ct ABL-a = 0.

**Rezultat:** **NEVAŽEĆI [nema transkripta za ABL] (INVALID [No ABL transcript])**. Pogledajte Slika 6.



Slika 6. Prozor za prikaz rezultata (View Results) GeneXpert:  
NEVAŽEĆI [nema transkripta za ABL] (INVALID [No ABL transcript])

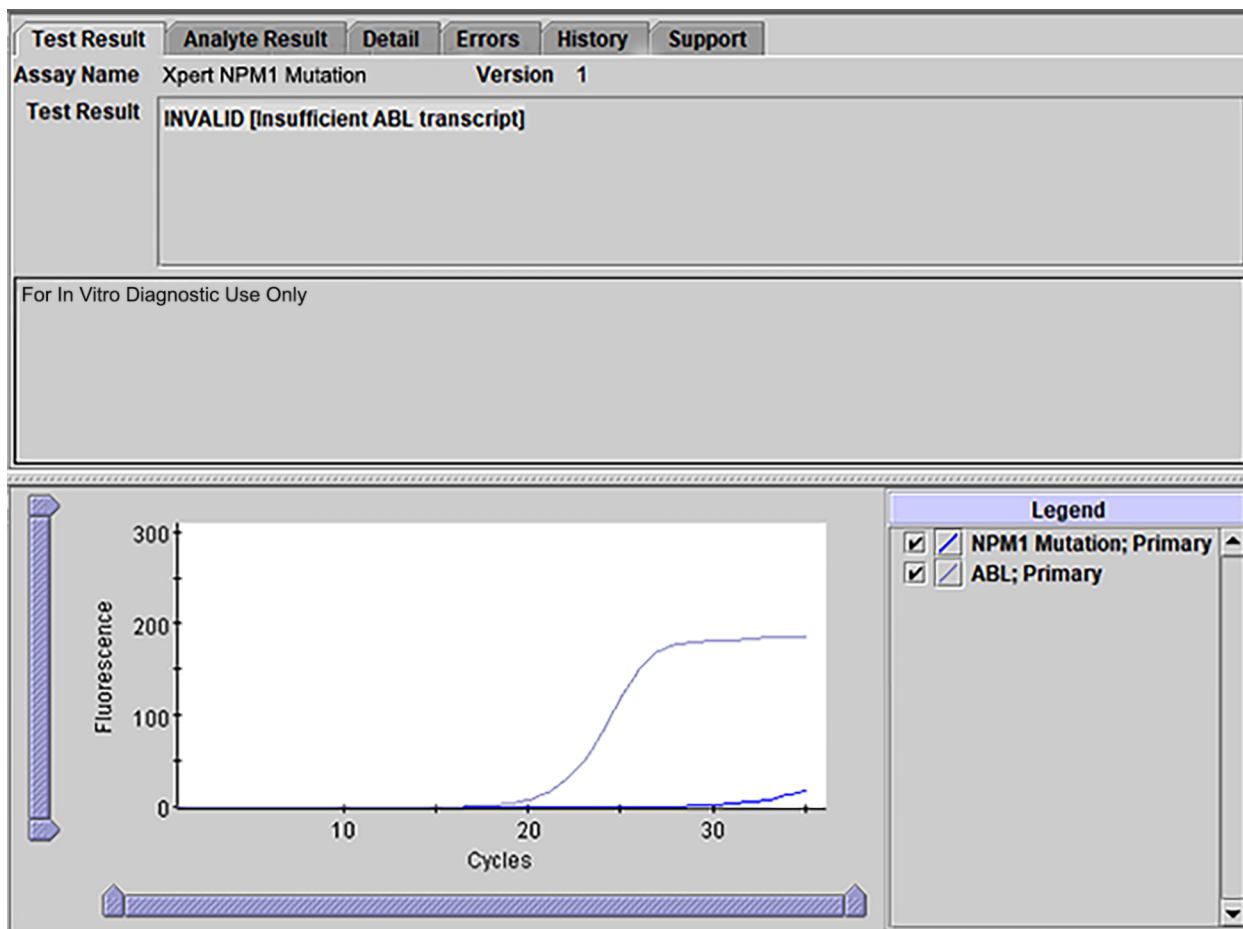
## 16.6 NEVAŽEĆI [nedovoljno transkripta za ABL] (INVALID [Insufficient ABL transcript])

Mutacija gena NPM1 otkrivena je ili nije otkrivena uz Ct ABL-a veći od „20“.

Softver GeneXpert zahtijeva da Ct ABL-a bude veći ili jednak „6“ te manji ili jednak „20“ za test Xpert NPM1 Mutation kako bi se osiguralo „dovoljno transkripta ABL-a“. Proučite Odjeljak 18, Vodič za otklanjanje poteškoća.

**Primjer:** Ct mutacije gena NPM1 na testu = 33,3; Ct ABL-a = 20,2 je veći od „20“.

**Rezultat:** **NEVAŽEĆI [nedovoljno transkripta za ABL] (INVALID [Insufficient ABL transcript]).**  
Pogledajte Sliku 7.



Slika 7. Prozor za prikaz rezultata (View Results) GeneXpert: NEVAŽEĆI [nedovoljno transkripta za ABL] (INVALID [Insufficient ABL transcript])

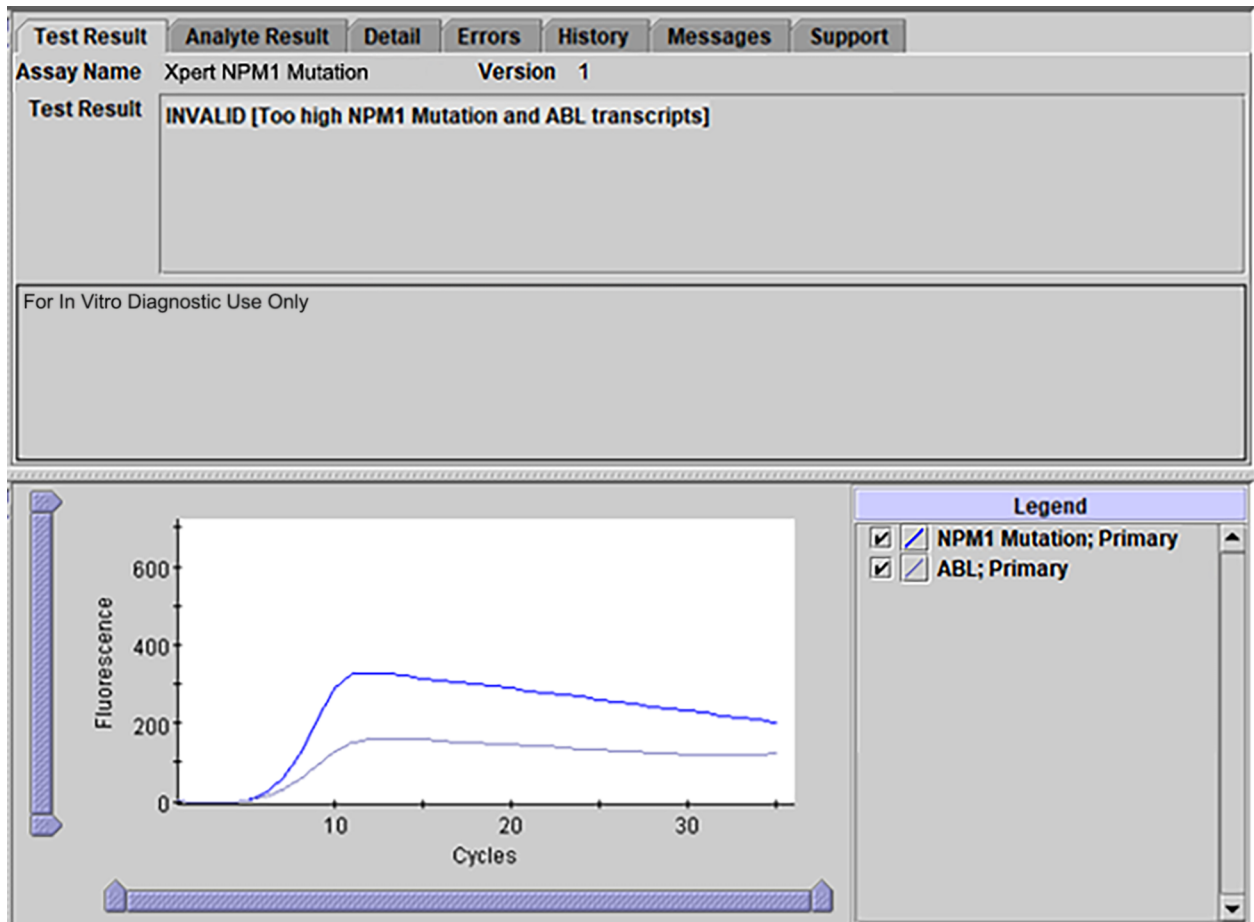
## 16.7 NEVAŽEĆI [previsok transkript mutacije gena NPM1 i ABL-a] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcript])

Mutacija gena NPM1 otkrivena je uz Ct-ove mutacije gena NPM1 i ABL-a veće od „0” i manje od „6”.

Softver GeneXpert zahtijeva da Ct ABL-a bude veći ili jednak „6” te manji ili jednak „20” za test Xpert NPM1 Mutation kako bi se osiguralo „dovoljno transkripta ABL-a”. Proučite Odjeljak 18, Vodič za otklanjanje poteškoća.

**Primjer:** Ct mutacije gena NPM1 na testu = 5,4 je veći od „0” i manji od „6”; Ct ABL-a = 5,9 je manji od „6”.

**Rezultat:** **NEVAŽEĆI [previsok transkript mutacije gena NPM1 i ABL-a] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcript])**. Pogledajte Slika 8.



Slika 8. GeneXpert DxProzor Prikaz rezultata (View Results): NEVAŽEĆI [previsok transkript mutacije gena NPM1 i ABL-a] (INVALID [Too high NPM1 Mutation and ABL transcript])

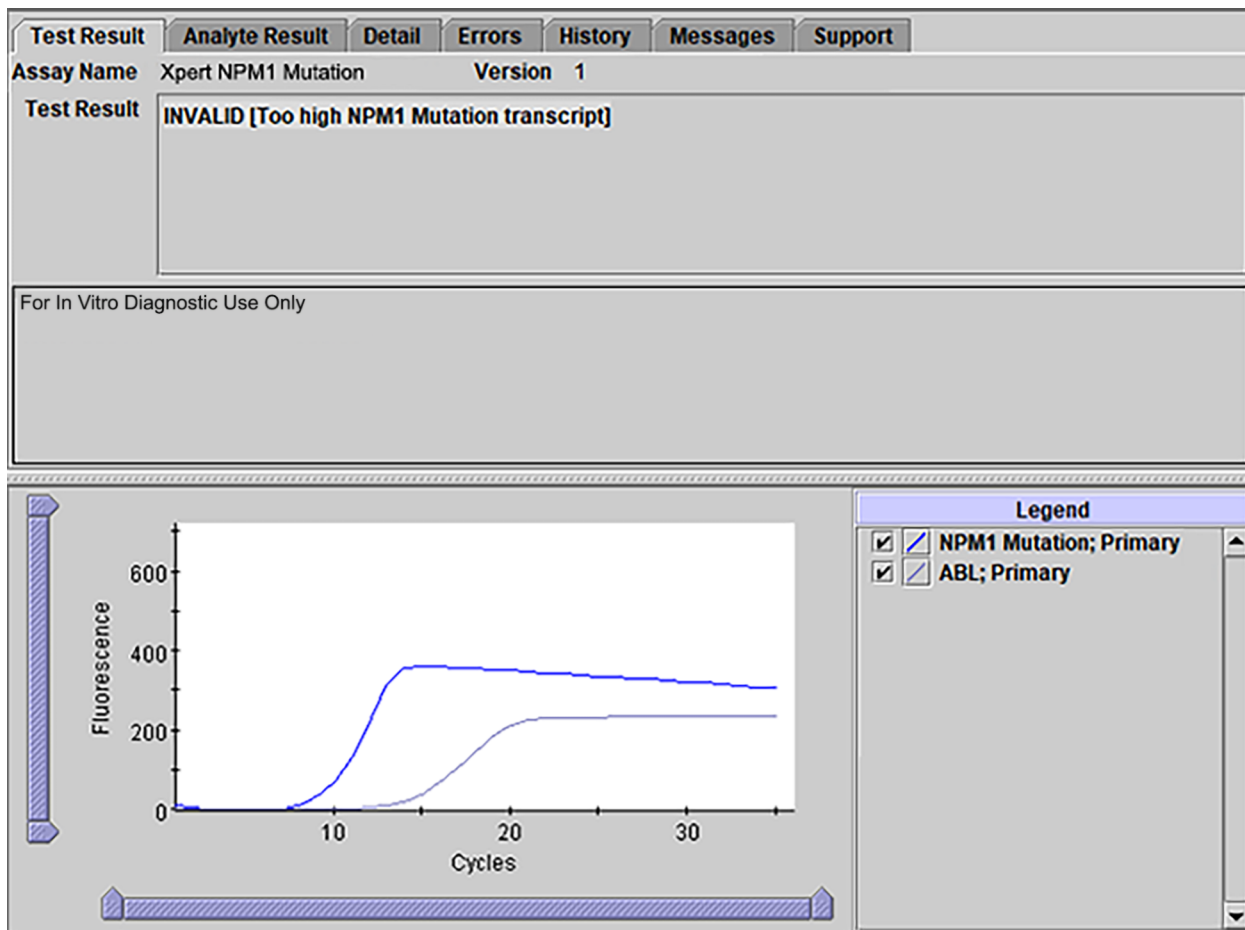
## 16.8 NEVAŽEĆI [previsok transkript mutacije gena NPM1] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcript])

Mutacija gena NPM1 otkrivena je uz Ct mutacije gena NPM1 veći od „0” i manji od „6”, a Ct ABL-a veći od „6”, a manji ili jednak „20”.

Softver GeneXpert zahtijeva da Ct ABL-a bude veći ili jednak „6” te manji ili jednak „20” za test Xpert NPM1 Mutation kako bi se osiguralo „dovoljno transkripta ABL-a”. Proučite Odjeljak 18, Vodič za otklanjanje poteškoća.

**Primjer:** Ct mutacije gena NPM1 na testu = 5,8 je veći od „0” i manji od „6”; Ct ABL-a = 13 je između „6” i „20”.

**Rezultat:** **NEVAŽEĆI [previsok transkript mutacije gena NPM1] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcript])**. Pogledajte Slika 9.



Slika 9. Prozor za prikaz rezultata (View Results) GeneXpert: NEVAŽEĆI [previsok transkript mutacije gena NPM1] (INVALID [Too high NPM1 Mutation transcript])

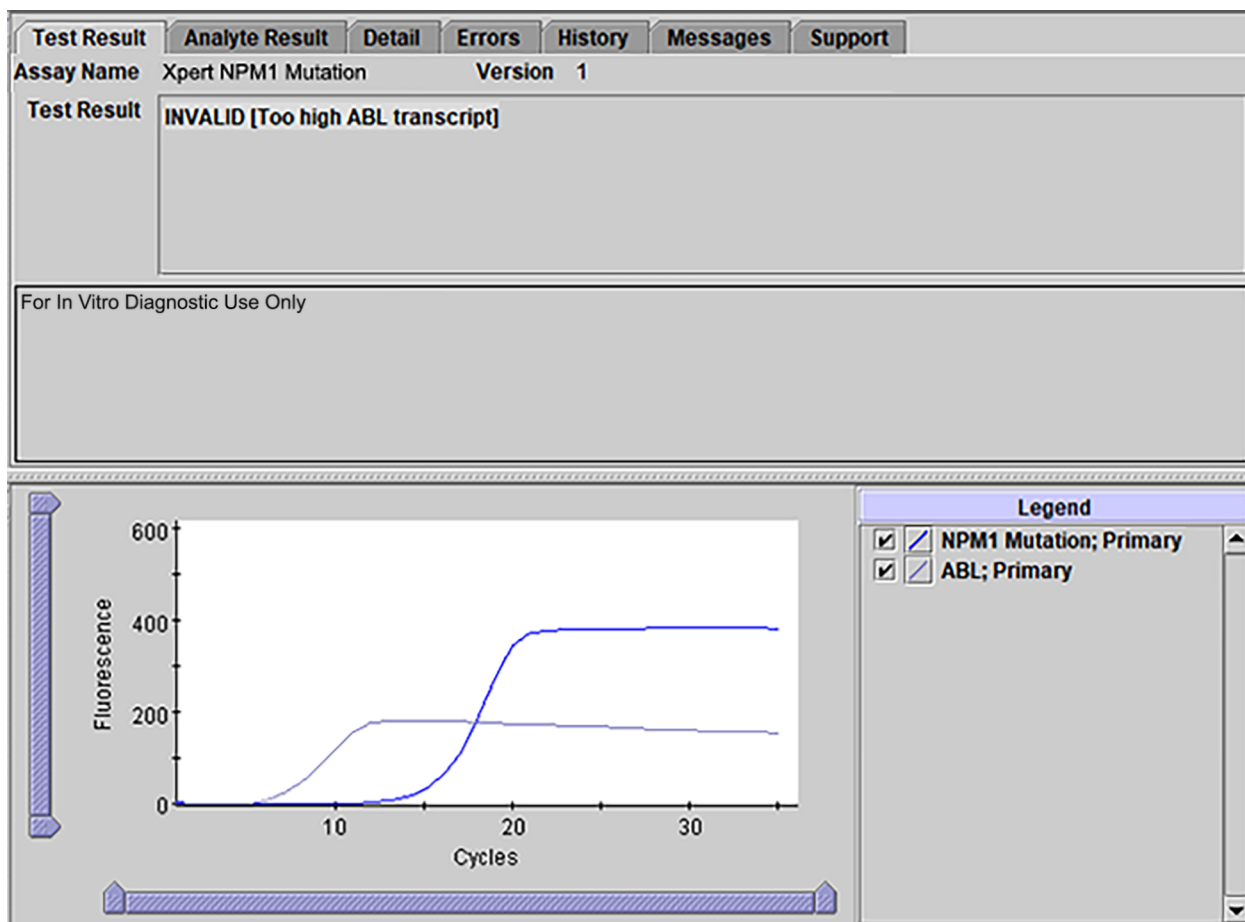
## 16.9 NEVAŽEĆI [previsok transkript mutacije ABL-a] (INVALID [Too high ABL Mutation transcript])

Mutacija gena NPM1 otkrivena je uz Ct mutacije gena NPM1 veći od „6” i manji od ili jednak „32”, a Ct ABL-a nije jednak „0” i manji je od „6”.

Softver GeneXpert zahtijeva da Ct ABL-a bude veći ili jednak „6” te manji ili jednak „20” za test Xpert NPM1 Mutation kako bi se osiguralo „dovoljno transkripta ABL-a”. Proučite Odjeljak 18, Vodič za otklanjanje poteškoća.

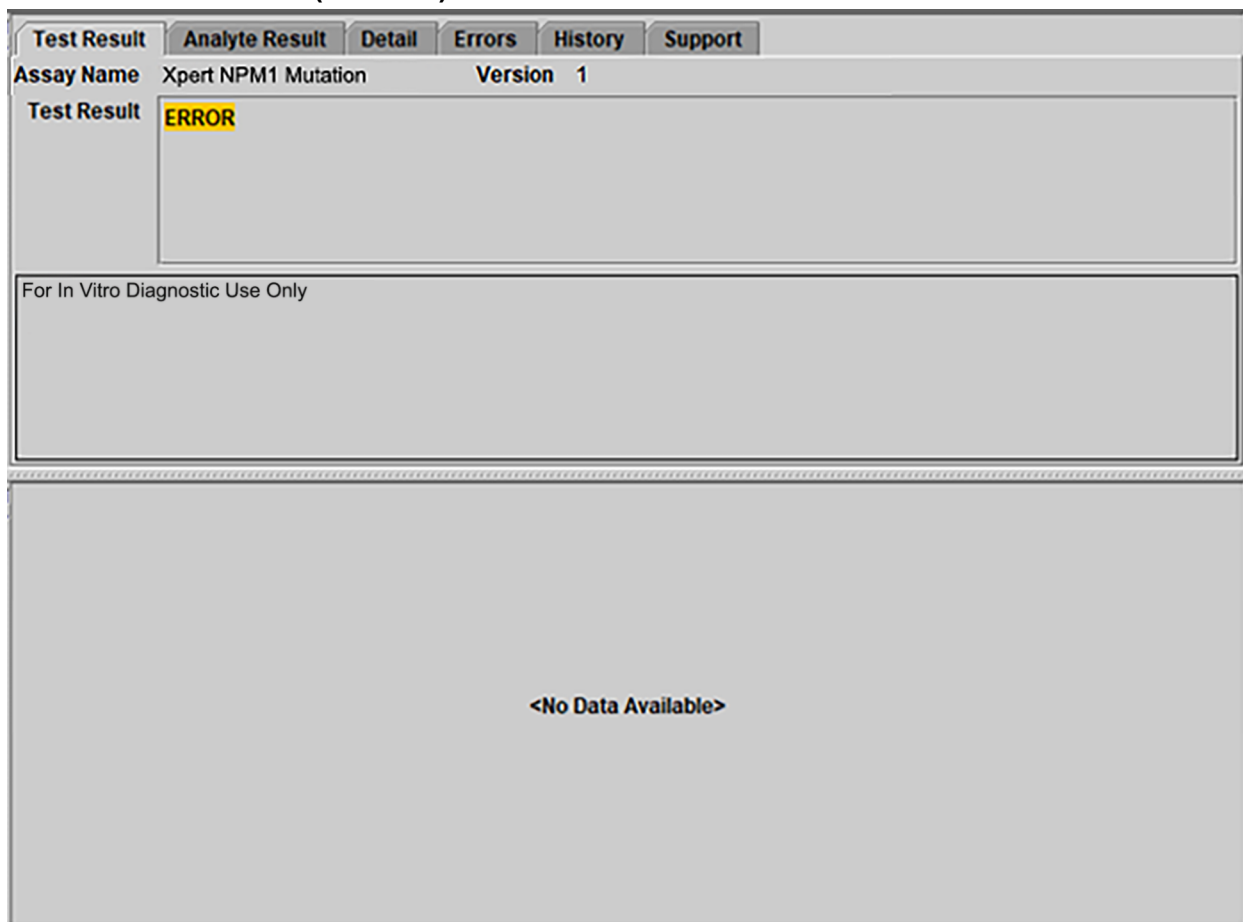
**Primjer:** Ct mutacije gena NPM1 na testu = 13,2; Ct ABL-a = 5,8 je veći od „6”.

**Rezultat:** **NEVAŽEĆI [previsok transkript za ABL] (INVALID [Too high ABL transcript]).**  
Pogledajte Sliku 10.



Slika 10. Prozor za prikaz rezultata (View Results) GeneXpert: NEVAŽEĆI [previsok transkript za ABL] (INVALID [Too high ABL transcript])

## 16.10 POGREŠKA (ERROR)



Slika 11. Prozor za prikaz rezultata (View Results) GeneXpert: POGREŠKA (ERROR)

## 17 Ograničenja testa

- Test nije namijenjen za upotrebu s vanjskim kalibratorima.
- Izmjene ovih procedura mogu izmijeniti funkciju testa.
- Ovaj je proizvod osmišljen samo za upotrebu s krvi prikupljenom u EDTA epruvete.
- Nemojte upotrebljavati heparin kao antikoagulans jer može inhibirati reakciju PCR.
- Nisu potvrđeni natrijev citrat, puferski sloj i vrste uzoraka s koštanom srži.
- Pogrešni rezultati testa mogu se javiti zbog neodgovarajućeg prikupljanja uzorka, rukovanja uzorkom i njegova skladištenja ili zamjene uzoraka. Da bi se izbjegli pogrešni rezultati, potrebno je pažljivo se pridržavati uputa za upotrebu.
- Mutacije ili polimorfizmi u regijama vezivanja početnice ili sonde mogu utjecati na otkrivanje novih ili nepoznatih varijanti te dovesti do lažno negativnog rezultata.
- Previsok broj leukocita može izazvati nakupljanje tlaka u ulošku i dovesti do prekida pokretanja testova ili netočnih rezultata.
- Neki uzorci s vrlo niskim razinama transkripta ABL-a ili s brojem leukocita manjim od 150 000 stanica/ml mogu se prijaviti kao **NEVAŽEĆI (INVALID)** (tip 1). Neodređeni rezultat ne isključuje prisutnost vrlo niskih razina stanica leukemije u uzorku.

## 18 Vodič za otklanjanje poteškoća

Tablica 3. Vodič za otklanjanje poteškoća

Rezultat testa	Mogući uzroci	Prijedlozi
<b>NEVAŽEĆI (INVALID)</b>	Tip 1: Kvar endogene kontrole ABL: <ul style="list-style-type: none"> <li>Loša kvaliteta uzorka</li> <li>Inhibicija reakcije RT-PCR</li> <li>Ct ABL-a &gt; 20 i/ili krajnja točka &lt; 100</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Provjerite kvalitetu uzorka (npr. premašen zahtjev za čuvanje uzorka, uključujući vrijeme i temperaturu).</li> <li>Ponovite test s izvornim uzorkom (ako je dostupan) ili iz sačuvanog lizata i s novim uloškom pridržavajući se postupka opisanog u odjeljku Odjeljak 19.1, Postupak ponovnog testiranja za rezultate POGREŠKA (ERROR) ili NEVAŽEĆI (INVALID) (tip 1).</li> </ul>
	Tip 2: Razina transkripta mutacije gena NPM1 ne može se odrediti jer uzorak sadržava previše transkripta mutacije gena NPM1 i/ili ABL-a (Ct < 6)	Ponovite test s izvornim uzorkom (ako je dostupan) ili iz sačuvanog lizata i s novim uloškom pridržavajući se postupka opisanog u odjeljku Odjeljak 19.2, Postupak ponovnog testiranja za rezultate POGREŠKA (ERROR) (šifra 2008) ili NEVAŽEĆI (INVALID) (tip 2).
<b>POGREŠKA (ERROR)</b> (šifra 2008)	Premašeno ograničenje tlaka (poruka o pogrešci 2008)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Provjerite kvalitetu uzorka</li> <li>Provjerite je li broj leukocita izrazito povišen</li> <li>Ponovite test s izvornim uzorkom (ako je dostupan) ili iz sačuvanog lizata i s novim uloškom pridržavajući se postupka opisanog u odjeljku Odjeljak 19.2, Postupak ponovnog testiranja za rezultate POGREŠKA (ERROR) (šifra 2008) ili NEVAŽEĆI (INVALID) (tip 2).</li> </ul>
<b>POGREŠKA (ERROR)</b> (šifra 5006, 5007, 5008 i 5009*) *Ovo nije cjelokupan popis šifri POGREŠKA (ERROR).	Kvar provjere sonde	Ponovite test s izvornim uzorkom (ako je dostupan) ili iz sačuvanog lizata i s novim uloškom pridržavajući se postupka opisanog u odjeljku Odjeljak 19.1, Postupak ponovnog testiranja za rezultate POGREŠKA (ERROR) ili NEVAŽEĆI (INVALID) (tip 1).
<b>NEMA REZULTATA (NO RESULT)</b>	Neuspješno prikupljanje podataka. Na primjer, korisnik je zaustavio test koji je bio u tijeku ili je došlo do nestanka napajanja.	Ponovite test s izvornim uzorkom (ako je dostupan) ili iz sačuvanog lizata i s novim uloškom pridržavajući se postupka opisanog u odjeljku Odjeljak 19.1, Postupak ponovnog testiranja za rezultate POGREŠKA (ERROR) ili NEVAŽEĆI (INVALID) (tip 1).

## 19 Ponovno testiranje

### 19.1 Postupak ponovnog testiranja za rezultate POGREŠKA (ERROR) ili NEVAŽEĆI (INVALID) (tip 1)

Ponovno testirajte uzorke s rezultatima **POGREŠKA (ERROR)** ili **NEVAŽEĆI (INVALID)** jer je prag ciklusa (Ct) ABL-a premašio maksimalni važeći Ct (Ct > 20) ili je krajnja točka ispod postavke praga (< 100). Proučite i Odjeljak 18, Vodič za otklanjanje poteškoća.

1. Ako je dostupno dovoljno volumena uzorka krvi, provedite ponovno testiranje iz izvorne epruvete za prikupljanje uzorka krvi pridržavajući se postupka navedenog u Odjeljak 12.2.

-ILI-

Ako volumen uzorka krvi nije dovoljan, može se provesti ponovno testiranje sa sačuvanim lizatom iz Odjeljak 12.2.1, koraka 12.

- a. Ako se sačuvani lizat iz Odjeljak 12.2.1, koraka 12 čuva zamrznut, odmrznite ga na sobnu temperaturu prije upotrebe.
  - b. Osigurajte dobro miješanje lizata kontinuiranim miješanjem uzorka u vrtložnoj miješalici na najvišoj postavci 10 sekundi i ostavite ga sa strane 3 minute da se mjehurići slegnu.
2. Prenesite 1 ml pripremljenog lizata u novu konusnu epruvetu od 50 ml.
  3. Slijedite korake 13 – 17 u Odjeljak 12.2.1 kako biste proizveli konačni lizat.
  4. Otvorite uložak podizanjem poklopca uloška i prenesite cjelokupan sadržaj jedne (1) ampule reagensa za pranje u komoru s reagensom za pranje (s malim otvorom). Pogledajte Slika 1.
  5. Pipetirajte cjelokupan sadržaj pripremljenog uzorka u komoru za uzorak (veliki otvor). Pogledajte Slika 1.
  6. Zatvorite poklopac uloška. Pokrenite test (pogledajte Odjeljak 12.4, Pokretanje testa).

### 19.2 Postupak ponovnog testiranja za rezultate POGREŠKA (ERROR) (šifra 2008) ili NEVAŽEĆI (INVALID) (tip 2)

Ponovno testirajte uzorke s razinama transkripta mutacije gena NPM1 i/ili ABL-a ispod važeće najmanje vrijednosti Ct-a (Ct > 0 i Ct < 6) i/ili ako je premašeno ograničenje tlaka. Proučite i Odjeljak 18, Vodič za otklanjanje poteškoća.

1. Na dno nove konusne epruvete od 50 ml dodajte 100 µl proizvoda PK (proteinaza K).
2. Pobrnite se da se uzorak krvi ili preostali lizat iz Odjeljak 12.2, koraka 12 dobro promiješa preokretanjem epruvete 8 puta neposredno prije pipetiranja.
3. U epruvetu koja već sadržava proteinazu K dodajte 250 µl uzorka krvi i 3,75 ml PBS-a (pH 7,4, koji osigurava korisnik), ako je dostupan, ili 60 µl sačuvanog lizata iz Odjeljak 12.2.1, koraka 12.
  - a. Ako se sačuvani lizat iz Odjeljak 12.2.1, koraka 12 čuva zamrznut, odmrznite ga na sobnu temperaturu prije upotrebe.
  - b. Osigurajte dobro miješanje lizata kontinuiranim miješanjem uzorka u vrtložnoj miješalici na najvišoj postavci 10 sekundi i ostavite ga sa strane 3 minute da se mjehurići slegnu.
4. Kontinuirano miješajte uzorak u vrtložnoj miješalici 3 sekunde na najvećoj postavci.
5. Inkubirajte 1 minutu na sobnoj temperaturi.
6. Za ponovno testiranje uzorka krvi pomoću PBS-a slijedite korake 6 – 17 u Odjeljak 12.2.1 da biste izradili konačni lizat. Za ponovno testiranje uzorka sačuvanog lizata slijedite korake a – g u nastavku da biste izradili konačni lizat.
  - a. U epruvetu s uzorkom za ponovno testiranje sačuvanog lizata dodajte 2,5 ml reagensa za lizu.
  - b. Kontinuirano miješajte uzorak u vrtložnoj miješalici 10 sekundi na najvećoj postavci.
  - c. Inkubirajte 5 minuta na sobnoj temperaturi.
  - d. Kontinuirano miješajte uzorak u vrtložnoj miješalici 10 sekundi na najvećoj postavci.
  - e. Inkubirajte 5 minuta na sobnoj temperaturi.
  - f. U istu epruvetu dodajte 2 ml apsolutnog etanola reagensijske čistoće (koji osigurava korisnik)
  - g. Kontinuirano miješajte uzorak u vrtložnoj miješalici 10 sekundi na najvećoj postavci. Stavite sa strane.
7. Otvorite uložak podizanjem poklopca uloška i prenesite cjelokupan sadržaj jedne (1) ampule reagensa za pranje u komoru s reagensom za pranje (s malim otvorom). Pogledajte Slika 1.
8. Pipetirajte cjelokupan sadržaj pripremljenog uzorka u komoru za uzorak (veliki otvor). Pogledajte Slika 1.
9. Zatvorite poklopac uloška. Pokrenite test (pogledajte Odjeljak 12.4, Pokretanje testa).



## 20 Očekivane vrijednosti

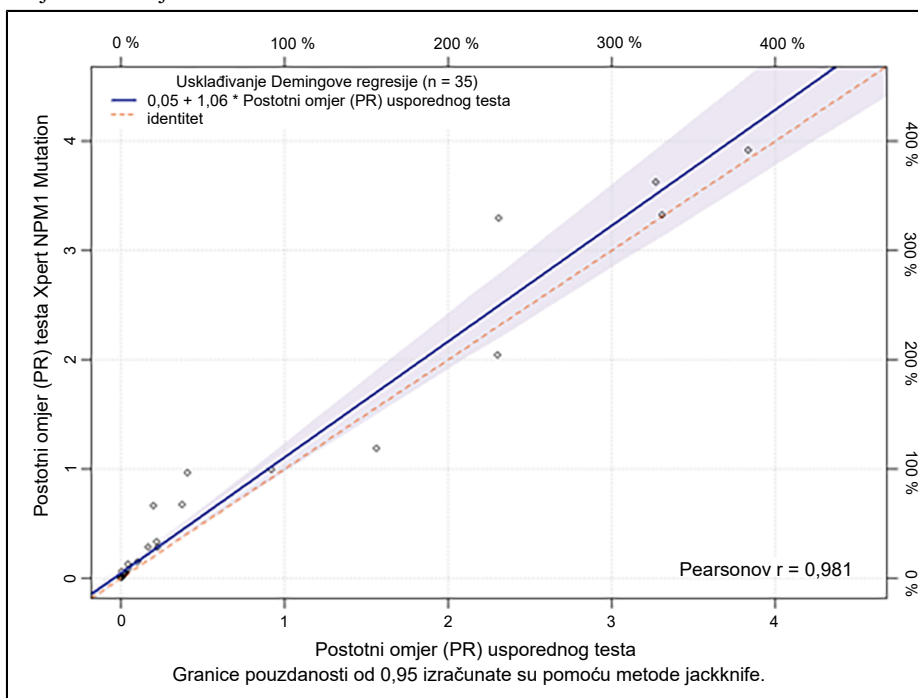
Raspon testa Xpert NPM1 Mutation obuhvaća ključne točke kliničke odluke za nadzor AML-a. Očekivane vrijednosti izražavaju se kao postotni omjer mRNK mutacije gena NPM1 i mRNK ABL-a te se kreću u rasponu od 0,030 % do 500 %. Mjerenja ispod tog raspona prijavljuju se kao neotkrivena ili ispod granice otkrivanja (LoD-a). Mjerenja iznad tog raspona prijavljuju se kao iznad granice kvantifikacije (LoQ-a). Proučite Odjeljak 15 za pojedinosti.

## 21 Klinička učinkovitost

Multicentrično, opservacijsko ispitivanje s usporedbom metoda provedeno je na tri lokacije u Sjedinjenim Državama i jednoj lokaciji izvan Sjedinjenih Država. U ispitivanje su uključeni uzorci od 40 određenih bolesnika s AML-om koji imaju mutaciju gena NPM1 iz jedne vremenske točke i u dinamičkom rasponu testa Xpert NPM1 Mutation. Dob i spol prikupljeni su za bolesnike od kojih su dobiveni uzorci. Raspodjela prema spolu iznosila je 11 muškaraca (27,5 %) i 29 žena (72,5 %). Svi su uzorci dolazili od bolesnika u dobi od 16 do 81 godinu, uz prosječnu dob od 59,7 godina.

Svih 40 uzoraka dalo je valjane rezultate testa. Trideset i šest od 40 uzoraka dalo je rezultate unutar kvantitativnih raspona oba testa. Četiri uzorka isključena su iz Demingove regresije jer su uzorci bili negativni na testu Xpert NPM1 Mutation i/ili na usporednom testu. Dodatni uzorak isključen je jer se radilo o netipičnoj vrijednosti. U analizu Demingove regresije uključeno je ukupno 35 uzoraka.

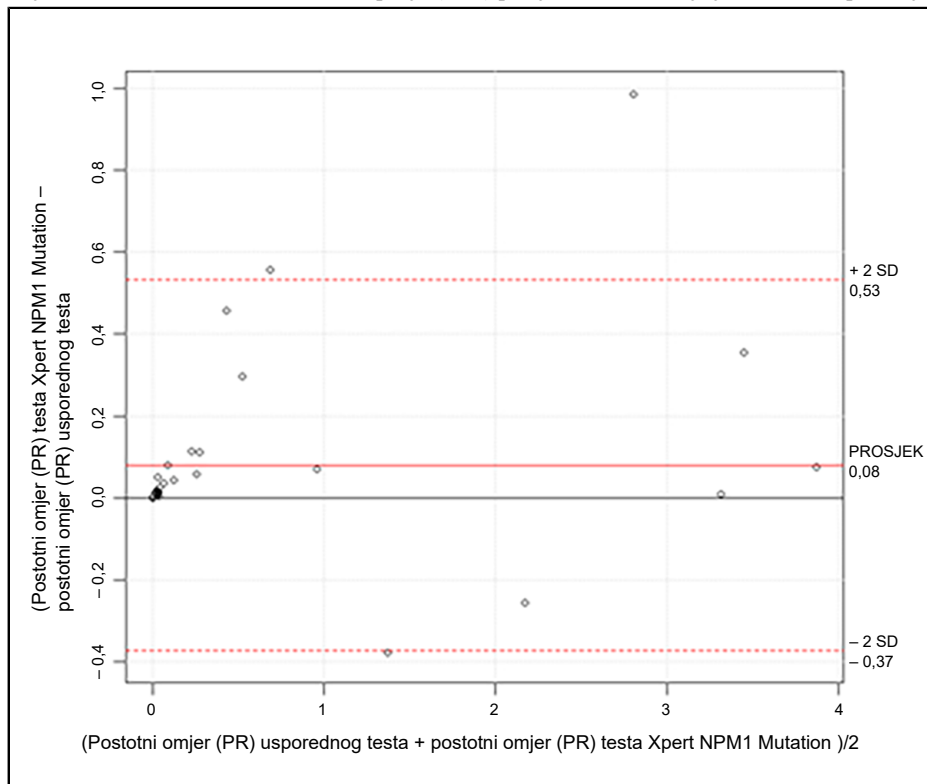
Učinkovitost testa Xpert NPM1 Mutation u usporedbi s usporednim testom procijenjena je pomoću Demingove regresije da bi se odredio pad i sjecište. Slika 12 predstavlja rezultate analize Demingove regresije, uključujući pad, sjecište i identifikacijsku liniju na 35 uzoraka. Granice pouzdanosti od 95 % izračunate su pomoću metode jackknife i prikazan je Pearsonov koeficijent korelacije.



Slika 12. Demingova regresija za postotni omjer

Pad i sjecište za postotni omjer iz analize Demingove regresije iznosili su 1,06; odnosno 0,05; a Pearsonova korelacija iznosila je 0,981 između mjerenja testa Xpert NPM1 Mutation i usporednog testa.

Bland Altmanova analiza razlike u postotnom omjeru procijenjena je za 35 uzoraka s kvantitativnim rezultatima koji su bili unutar linearnog raspona testa Xpert NPM1 Mutation i usporednog testa. Slika 13 prikazuje Bland Altmanov grafikon s razlikom u postotnom omjeru između dvaju testova u odnosu na prosječne rezultate postotnog omjera za svaki uzorak. Grafikon prikazuje i viša i niža dva standardna odstupanja (2SD) prosječne razlike koja je uočena u ispitivanju.



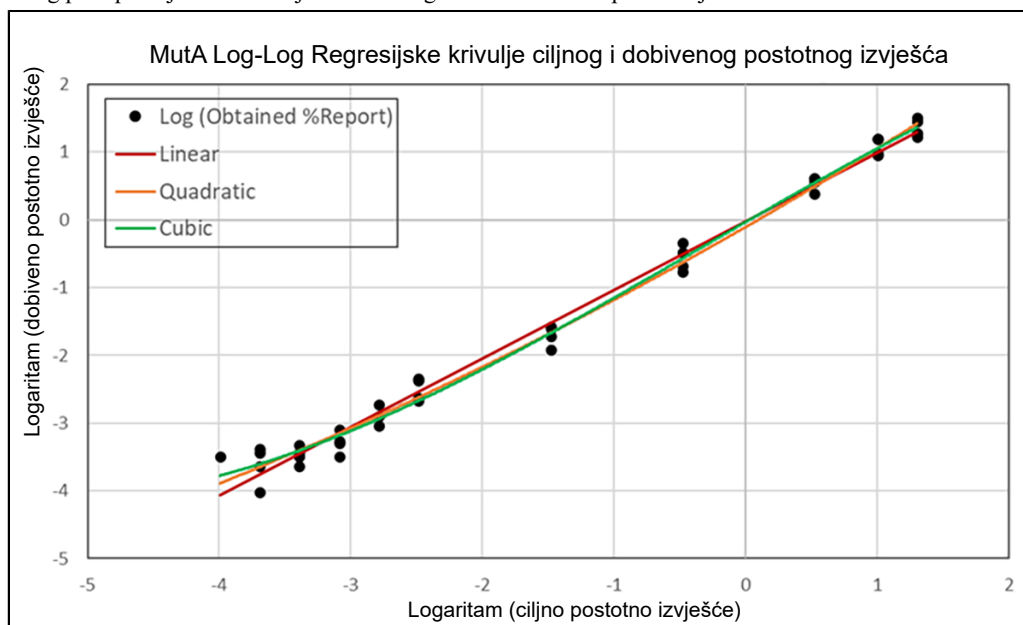
**Slika 13. Bland Altmanov grafikon za postotni omjer testa Xpert NPM1 Mutation i usporednog testa**

Prosječna razlika iznosila je 0,08 u postotnom omjeru između rezultata testa Xpert NPM1 Mutation i usporednog testa. Većina (91,4 %, 32/35) rezultata bili su unutar 2SD prosječne razlike.

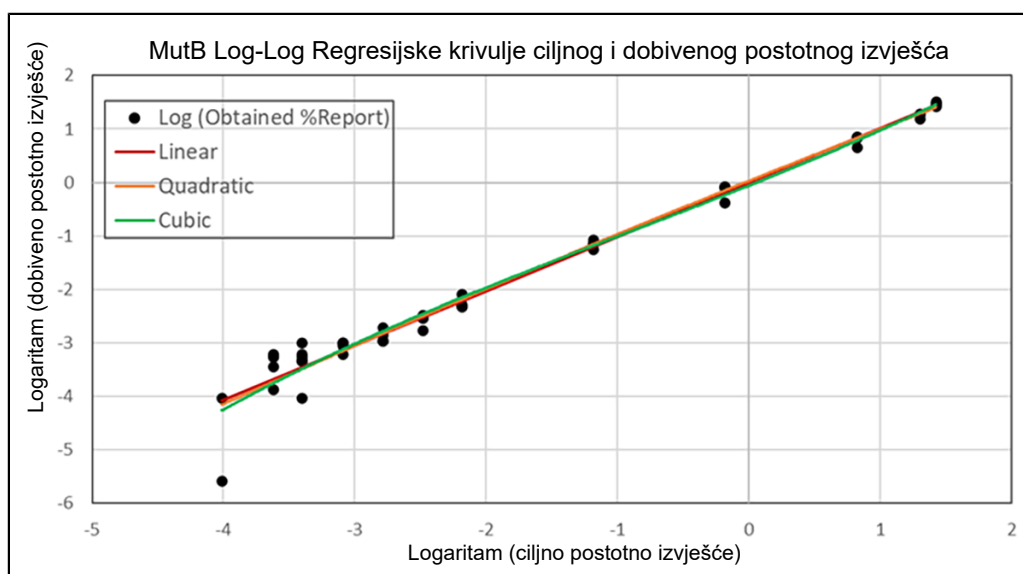
## 22 Analitički podaci

### 22.1 Linearnost/dinamički raspon

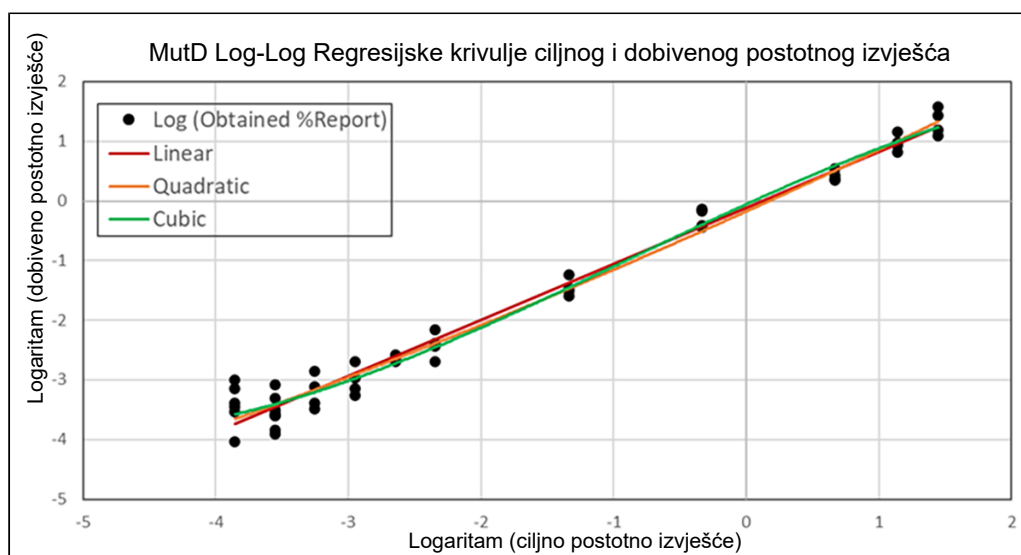
Linearnost je određena za svaki od tri podtipa mutantnog gena NPM1, mutA, mutB i mutD, pomoću lizata stanica koji sadržavaju visoke razine transkripta svakog podtipa. Takvi su lizati razrijeđeni u pozadinski lizat pripremljen od derivatelja pretpostavljeno negativnih na mutaciju gena NPM1 u ciljnim rasponima od ~ 0,01 – 2500 % mutacije gena NPM1/ABL. Sve razine testirane su jednom serijom reagensu u četiri ponavljanja. Testiranje i statističke analize provedene su u skladu s dokumentom EP06-A CLSI-ja<sup>9</sup>. Regresijske krivulje za svaki podtip prikazane su u Slika 14, Slika 15 i Slika 16. Linearni raspon svakog podtipa i njihovi koeficijenti linearnog modela sažeto su predstavljeni u Tablica 4.



Slika 14. Regresijske krivulje za mutA



Slika 15. Regresijske krivulje za mutB



Slika 16. Regresijske krivulje za mutD

Tablica 4. Sažetak linearnih raspona i koeficijenata linearnih modela

Podtip	Linearni raspon	Sjecište	Pad	R <sup>2</sup>
mutA	0,010 – 2020 %	– 0,0223	1,0134	0,989
mutB	0,010 – 2673 %	– 0,0061	1,0174	0,978
mutD	0,014 – 2783 %	– 0,1163	0,9389	0,981

Kolektivno, test Xpert NPM1 Mutation pokazao je linearnost unutar 0,014 – 2020 % mutacije gena NPM1/ABL. Ograničen LoQ-om i gornjom granicom softvera, dinamički raspon koji se mora prijaviti iznosi 0,030 – 500 %.

## 22.2 Analitička osjetljivost (granica otkrivanja, granica kvantifikacije, granica slijepe probe)

Granica otkrivanja (LoD) najniža je razina mutacije gena NPM1/ABL-a pri kojoj se 95 % uzoraka dosljedno prijavljuje kao „**Mutacija gena NPM1 OTKRIVENA (NPM1 Mutation DETECTED) [##,## %]**“. LoD je pojedinačno određen za podtipove mutA, mutB i mutD testiranjem serijskih razrjeđivanja lizata stanica pozitivnih na mutaciju gena NPM1 i kliničkih lizata koji imaju svaki podtip mutacije. Odgovarajući LoD-ovi procijenjeni su i potvrđeni u skladu sa smjernicom EP17-A2 Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI)<sup>10</sup>. Posljedične analize dale su LoD od 0,025 % za mutA, 0,023 % za mutB i 0,030 % za mutD (Tablica 5). Najviši LoD među tri podtipa pri 0,030 % uzima se kao ukupni LoD testa Xpert NPM1 Mutation.

Granica kvantifikacije (LoQ) najniža je razina mutacije gena NPM1/ABL-a iznad koje se uzorci mogu kvantificirati standardnim odstupanjem  $\leq 0,36$  logaritamskog smanjenja (LR) za prosječne LR-ove iznad 3,5. U skladu sa smjernicom EP17-A2 CLSI-ja<sup>10</sup>, LoQ-ovi su procijenjeni i potvrđeni pri 0,025 % za podtip mutA, 0,023 % za podtip mutB i 0,030 % za podtip mutD (Tablica 5). Najviši LoQ među tri podtipa pri 0,030 % uzima se kao ukupni LoQ testa Xpert NPM1 Mutation.

Granica slijepe probe (LoB) najviši je rezultat mutacije gena NPM1/ABL-a koji se očekuje među 95 % slijepih uzoraka od darivatelja za koje se pretpostavlja da su negativni na mutaciju gena NPM1. U skladu sa smjernicom EP17-A2 CLSI-ja<sup>10</sup>, LoB testa Xpert NPM1 Mutation procijenjen je i potvrđen na 0,0085 % (Tablica 5).

**Tablica 5. Granica otkrivanja, granica kvantifikacije i granica slijepe probe testa Xpert NPM1 Mutation [% mutacije gena NPM1/ABL-a]**

Podtip	LoD [% mutacije gena NPM1/ABL-a]	LoQ [% mutacije gena NPM1/ABL-a]	LoB [% mutacije gena NPM1/ABL-a]
mutA	0,025 %	0,025 %	0,0085 %
mutB	0,023 %	0,023 %	
mutD	0,030 %	0,030 %	

## 22.3 Analitička specifičnost

Analitička specifičnost testa Xpert NPM1 Mutation određena je testiranjem uzoraka periferne krvi obrađene kiselinom EDTA uzete od dvadeset i pet zdravih darivatelja.

Nije dobiven rezultat Mutacija gena NPM1 **OTKRIVENA (NPM1 Mutation DETECTED)** iz nijednog od uzoraka pretpostavljeno negativnih na mutaciju gena NPM1 koji su procijenjeni u ovom ispitivanju. Stoga je test Xpert NPM1 Mutation specifičan za transkripte mRNK mutanog gena NPM1 (tipova A, B i D u egzonu 12) koji se povezuju s AML-om i ima analitičku specifičnost od 100 % za uzorke periferne krvi obrađene EDTA-om.

## 22.4 Procjena prenosivosti kontaminacije

Provedeno je ispitivanje kako bi se dokazalo da jednokratni, autonomni ulošci GeneXpert sprječavaju prenosivost kontaminacije iz uzastopno pokrenutih uložaka u istom modulu instrumenta. Pretpostavljeno negativan uzorak na mutaciju gena NPM1 testiran je nakon visoko pozitivnog uzorka na mutaciju gena NPM1 u istom modulu GeneXpert. Shema testiranja ponovljena je 10 puta u dva modula GeneXpert (ukupno 22 negativna i 20 pozitivnih rezultata). Sva pokretanja testova kod pozitivnih uzoraka dala su očekivani rezultat „**Mutacija gena NPM1 OTKRIVENA (NPM1 Mutation DETECTED [#,## %])**”, a sva pokretanja testova kod negativnih uzoraka dala su očekivani rezultat „**Mutacija gena NPM1 NIJE OTKRIVENA [dovoljno transkripta ABL-a] (NPM1 Mutation NOT DETECTED [Sufficient ABL transcript])**”.

## 22.5 Potencijalno ometajuće tvari

Ovo je ispitivanje procijenilo pet tvari koje mogu biti prisutne u uzorcima EDTA periferne krvi te mogu ometati učinkovitost testa. Testirani sastojci i razine (pogledajte Tablica 6) temeljili su se na smjernicama iz dokumenta EP07-ED3 CLSI-ja<sup>11</sup>. Ometajuće tvari testirane su u uzorcima EDTA periferne krvi umjetno dobivenima s lizatima uzgojenih stanica pozitivnih na mutaciju gena NPM1, koji predstavljaju tri razine: > 1 %, 0,1 – 0,5 % i negativni. Testne kontrole sastojale su se od istih uzoraka bez potencijalno ometajućih tvari. Svaki uzorak testiran je u odsutnosti i prisutnosti pet pojedinačnih ometajućih tvari uz četiri ponavljanja po uvjetu. Smatralo se da neka tvar nije ometajuća ako je u njezinoj prisutnosti uočen prosječni postotni omjer bio unutar trostruke razlike, u usporedbi s kontrolom.

Nisu uočeni klinički značajni inhibicijski učinci na test Xpert NPM1 Mutation ni sa kojom od ometajućih tvari procijenjenih u ovom ispitivanju. Nisu uočene statistički značajne razlike (p-vrijednost < 0,05) u svim testiranim uvjetima, a prijavljeni postotni omjeri između testnih i kontrolnih uvjeta bili su unutar prihvatljivog trostrukog raspona.

**Tablica 6. Potencijalno ometajuće tvari testirane testom Xpert NPM1 Mutation**

Ometajuće tvari	Testirana koncentracija
Nekonjugirani bilirubin	20 mg/dl
Kolesterol, ukupni	500 mg/dl
Trigliceridi, ukupni (lipidi)	3000 mg/dl
Heparin	3500 U/L
EDTA (epruveta male zapremnine)	930 mg/dl

## 23 Reproducibilnost i preciznost

Ispitivanje je osmišljeno u skladu s općim načelima usvojenima u standardu EP05-A3 Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI) za multifaktorijalna ispitivanja. Provedeno je na tri lokacije. Nacrt ispitivanja uključivao je članove panela uzoraka koji su uključivali mutacije A, B i D u dvije koncentracije. Svaki od dvaju korisnika testirao je sedam članova panela u dva primjerka, dva pokretanja testova na dan, za ukupno 6 dana na tri različite lokacije (3 lokacije × 2 korisnika × 3 serije × 2 dana × 2 pokretanja testova × 2 ponavljanja = 144 rezultata testova/član panela). Tvrtka Cepheid pripremila je panele reproducibilnosti i preciznosti i sastojali su se od sedam članova panela kako je prikazano u Tablica 7. Paneli su umjetno testirani u simuliranoj matrici EDTA periferne krvi (PB).

**Tablica 7. Paneli reproducibilnosti i preciznosti**

Član panela	Cilj	Postotni omjer (PR) razine
1	Negativan	NP (NA)
2	Mutacija A gena NPM1	Umjereno pozitivan (~ 5 %)
3	Mutacija A gena NPM1	Nisko pozitivan (~ 0,2 %)
4	Mutacija B gena NPM1	Umjereno pozitivan (~ 5 %)
5	Mutacija B gena NPM1	Nisko pozitivan (~ 0,2 %)
6	Mutacija D gena NPM1	Umjereno pozitivan (~ 5 %)
7	Mutacija D gena NPM1	Nisko pozitivan (~ 0,2 %)

Broj uzoraka s valjanim rezultatima za svakog člana panela koji je analizirao svaki od dvaju korisnika na tri lokacije prikazan je u Tablica 8.

**Tablica 8. Reproducibilnost i preciznost: Broj uzoraka s valjanim rezultatima**

Član panela	Lokacija 1			Lokacija 2			Lokacija 3			Ukupno uzoraka
	Op 1	Op 2	Lokacija	Op 1	Op 2	Lokacija	Op 1	Op 2	Lokacija	
1 Negativan	24/24 <sup>a</sup>	(24/24)	(48/48) <sup>a</sup>	(24/24) <sup>b</sup>	(24/24)	(48/48) <sup>b</sup>	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
2 LR1.3: mut A (~ 5 %-tni omjer)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
3 LR2.7: mut A (~ 0,2 %-tni omjer)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
4 LR1.3: mut B (~ 5 %-tni omjer)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
5 LR2.7: mut B (~ 0,2 %-tni omjer)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
6 LR1.3: mut D (~ 5 %-tni omjer)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)
7 LR2.7: mut D (~ 0,2 %-tni omjer)	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(24/24) <sup>c</sup>	(24/24)	(48/48) <sup>c</sup>	(24/24)	(24/24)	(48/48)	(144/144)

<sup>a</sup> Dva negativna uzorka imala su valjane, ali otkrivene rezultate (FP)

<sup>b</sup> Jedan negativan uzorak imao je valjani, ali otkriven rezultat (FP)

<sup>c</sup> Jedan uzorak LR 2.7: mut D (~ 0,2 %-tni omjer) imao je valjani rezultat, ali koji nije otkriven (FN)

Kvantitativni rezultati analizirani su ugniježđenom analizom varijance (ANOVA) s nasumičnim učincima i koeficijentom varijacije (CV). Rezultati izračuna ANOVA za standardno odstupanje i varijanca za svaki pozitivni uzorak navedeni su u Tablica 9. Varijanca i postotak ukupne varijance kojoj pridonosi svaka komponenta (lokacija/instrument, korisnik, serija, dan, pokretanje testa) označeni su kao SD i postotni doprinos svake komponente.

**Tablica 9. Rezultati koeficijenta varijacije (CV): Postotni omjer (PR)**

Član panela	N	Prosjeak	Lokacija		Op		Serija		Dan		Pokretanje testa		Među testovima		Ukupan	
			SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)	SD	CV (%)
LR1.3: mut A (~ 5 %-tni omjer)	144	4,3 %	0,00	6,14	0,00	0,00	0,00	4,29	0,00	8,91	0,00	4,36	0,01	17,83	0,01	21,74
LR2.7: mut A (~ 0,2 %-tni omjer)	144	0,2 %	0,00	0,00	0,00	12,43	0,00	0,00	0,00	23,71	0,00	0,00	0,00	74,56	0,00	79,22
LR1.3: mut B (~ 5 %-tni omjer)	144	5 %	0,00	8,24	0,00	0,00	0,01	11,50	0,00	7,19	0,00	0,00	0,01	20,88	0,01	26,23
LR2.7: mut B (~ 0,2 %-tni omjer)	144	0,2 %	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,48	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	19,28	0,00	20,68
LR1.3: mut D (~ 5 %-tni omjer)	144	4,2 %	0,00	5,15	0,00	0,00	0,01	12,91	0,00	8,78	0,00	0,00	0,01	18,30	0,01	24,60
LR2.7: mut D (~ 0,2 %-tni omjer)	143 <sup>a</sup>	0,2 %	0,00	10,86	0,00	0,00	0,00	12,91	0,00	6,77	0,00	0,00	0,00	22,83	0,00	29,18

<sup>a</sup> Jedan uzorak nije otkriven testom Xpert NPM1 i isključen je iz analize jer nije bilo kvantitativnog mjerenja.

Ukupni postotak koeficijenta varijacije (CV) postotnog omjera koji prijavljuje kvantitativne vrijednosti za umjereno pozitivne uzorke LR1.3: mut A, mut B i mut D (~ 5 %-tni omjer) kretao se od 21,74 do 26,23, a za nisko pozitivne uzorke LR2.7: mut A, mut B i mut D (~ 0,2 %-tni omjer) kretao se od 20,68 do 79,22.

## 24 Reference

1. Saultz JN, Garzon R. Acute myeloid leukemia: A concise review. *J Clin Med*. 2016; 5(3). doi:10.3390/jcm5030033
2. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015; 373(12): 1136-1152. doi:10.1056/NEJMra1406184
3. Diagnostic Molecular Pathology. A Guide to Applied Molecular Testing. <https://www.medic4arab.com/2017/01/diagnostic-molecular-pathology-guide-to.html>. Pristupljeno 16. rujna 2020.
4. Kunchala P, Kuravi S, Jensen R, McGuirk J, Balusu R. When the good go bad: Mutant NPM1 in acute myeloid leukemia. *Blood Rev*. 2018; 32(3): 167-183. doi:10.1016/j.blre.2017.11.001
5. Heath EM, Chan SM, Minden MD, Murphy T, Shlush LI, Schimmer AD. Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia*. 2017; 31(4): 798-807. doi:10.1038/leu.2017.30
6. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical laboratories (refer to latest edition). <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/>
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline. Dokument M29 (proučite najnovije izdanje).
8. Health-care Waste. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/health-care-waste>
9. CLSI EP06-A:2003 Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach, 1st Edition
10. CLSI EP17-A2:2012 Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures, 2nd Edition
11. CLSI EP07-ED3:2018 Interference Testing in Clinical Chemistry, 3rd Edition
12. CLSI EP05-A3:2014 Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline—Third Edition



## 25 Lokacije glavnih sjedišta tvrtke Cepheid

### Glavno sjedište

Cepheid  
904 Caribbean Drive  
Sunnyvale, CA 94089  
USA

Telefon: + 1 408 541 4191  
Telefaks: + 1 408 541 4192  
www.cepheid.com

### Europsko sjedište

Cepheid Europe SAS  
Vira Solelh  
81470 Maurens-Scopont  
France

Telefon: + 33 563 825 300  
Telefaks: + 33 563 825 301  
www.cepheidinternational.com

## 26 Tehnička pomoć

Prije nego što se obratite Tehničkoj podršci tvrtke Cepheid, prikupite sljedeće podatke:

- Naziv proizvoda
- Broj serije
- Serijski broj instrumenta
- Poruke o greškama (ako postoje)
- Verzija softvera i, ako je primjenjivo, broj servisne oznake računala

### Sjedinjene Države





















Telefon: + 1 888 838 3222  
E-pošta: techsupport@cepheid.com

### Francuska

Telefon: + 33 563 825 319  
E-pošta: support@cepheideurope.com

Podaci o kontaktu za sve urede tvrtke Cepheid za tehničku podršku dostupni su na našoj internetskoj stranici:  
[www.cepheid.com/en\\_US/support/contact-us](http://www.cepheid.com/en_US/support/contact-us).

## 27 Tablica simbola

Simbol	Značenje
	Kataloški broj
	Oznaka CE – sukladnost s europskim propisima
	<i>In vitro</i> dijagnostički medicinski proizvod
	Kod serije
	Ne upotrebljavati višekratno
	Proučite upute za upotrebu
	Proizvođač
	Država proizvodnje
	Sadrži dovoljno za <i>n</i> testova
	Kontrola
	Rok valjanosti
	Ograničenje temperature
	Biološki rizici
	Oprez
	Zapaljive tekućine
	Reproduktivna i razvojna toksičnost
	Upozorenje
	Ovlašteni predstavnik u Europskoj zajednici
	Ovlašteni predstavnik u Švicarskoj
	Uvoznik



Cepheid  
904 Caribbean Drive  
Sunnyvale, CA 94089  
SAD  
Telefon: + 1 408 541 4191  
Telefaks: + 1 408 541 4192



Cepheid Europe SAS  
Vira Solelh  
81470 Maurens-Scopont  
Francuska  
Telefon: + 33 563 825 300  
Telefaks: + 33 563 825 301



Cepheid Switzerland GmbH  
Zürcherstrasse 66  
Postfach 124, Thalwil  
CH-8800  
Switzerland



Cepheid Switzerland GmbH  
Zürcherstrasse 66  
Postfach 124, Thalwil  
CH-8800  
Switzerland



## 28 Povijest revizija

Odjeljak	Opis promjene
23	Ispravljena pogreška u odjeljku „Reproducibilnost i preciznost“.